



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>



THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA

EMIL FISCHER COLLECTION

PRESENTED BY HIS SON

Prof. Hermann Fischer

Basel

Rottmeyerstr. 22

HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. F. HOFMEISTER in Strassburg, Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Prof. E. LUDWIG in Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. C. A. PEKELHARING in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Marburg.

NEUNUNDZWANZIGSTER BAND.

Mit vier Tafeln und neun Abbildungen.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1900

Chemistry Lib.

Inhalt des neunundzwanzigsten Bandes.

HEFT I.

(Ausgegeben am 30. Dezember 1898.)

Seite
BIOCHEM.
LIBRARY

Thompson, W. H. Die physiologische Wirkung der Protamine und ihrer Spaltungsprodukte. Mit 7 Abbildungen	1
Jones, W. Ueber das Thymin	20
Freund, Walther. Zur Kenntniss der Schwefelausscheidung bei Säuglingen	24
Henderson, Yandell. Zur Kenntniss des durch Säuren abspaltbaren Stickstoffs der Eiweisskörper	47
Friedmann, Ernst. Ueber die Bindungsweise des Stickstoffs in primären Albumosen	51
Mayer, Paul. Ueber die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure	59
Wörner, E. Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure auf Grund der Fällung als Ammonurat	70
Arnold, V. Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes. Mit einer Abbildung	78
Schulz, Fr. Ueber Oxydation von krystallisirtem Eiereiweiss durch Wasserstoffsperoxyd	86

HEFT II.

(Ausgegeben am 22. Februar 1900.)

Fürth, Otto v. Zur Kenntniss der brenzcatechinähnlichen Substanz der Nebennieren. III. Mittheilung	105
Schulz, Fr. N. Kommt in der Sepia-Schulpe Cellulose vor? . .	124
Müller, Paul. Ueber die Reduction des Cholesterins zu Koprosterin im menschlichen Darmkanal	129
Hausmann, Walther. Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. II. Mittheilung	136
Keller, Arthur. Organische Phosphorverbindungen im Säuglingsharn, ihr Ursprung und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel	146
Küster, William. Spaltungsprodukte des Hämatins. II. Mittheilung. Ueber die Hämatine verschiedener Darstellungs- und Blutarten	185
Jolles, Adolf. Ueber die Einwirkung von Jodlösungen und alkalischer Permanganatlösung auf Harnsäure	193

HEFT III.

(Ausgegeben am 3. April 1900.)

Harnack, Erich. Ueber Indikanurie in Folge von Oxalsäurewirkung	205
Jolles, Adolf. Ueber eine neue zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harne. Mit einer Abbildung	222

M643301

Rumpf, Th., und O. Schumm. Ueber eine durch Fütterung mit Ammoniumsulfat erzeugte chemische Veränderung des Blutes	24
Mayer, P., und C. Neuberg. Ueber den Nachweis gepaarter Glucuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn . .	25
Neuberg, C. Ueber Löslichkeitsverhältnisse von Osazonen . .	27
Gulewitsch, Wl. Ein Fall von Meningocele	28
Cohn, Rudolf. Ueber Bildung von Basen aus Eiweiss	28
Steudel, H., und A. Kossel. Ueber das Thymin	30

HEFT IV und V.

(Ausgegeben am 9. Juni 1900.)

Lang, S. Ueber die Schwefelausscheidung nach Leberexstirpation .	30
Henderson, Y. Ein Beitrag zur Kenntniss der Hexonbasen . . .	32
Schulze, E. Einige Bemerkungen über das Arginin	32
Ellinger, A. Die Constitution des Ornithins und des Lysins. Zugleich ein Beitrag zur Chemie der Eiweissfäulniss	33
Ransom, F. Die Lymphe nach intravenöser Injection von Tetanustoxin und Tetanusantitoxin	34
Schulz, Fr. N., und Fritz Dittborn. Galaktosamin, ein neuer Amidozucker, als Spaltungsprodukt des Glykoproteids der Eiweissdrüse des Frosches	37
Wetzel, G. Die organischen Substanzen der Schalen von Mytilus und Pina	38
Prüschner, Fr. Ueber Acetophenonazobilirubin. Mit einer Tafel .	41
Formánek, Em. Ueber die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff	41
Andersson, Justus. Zur Kenntniss der Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen	42
Kölle, M. Weiteres über das Invertin	42
Salkowski, E. Ueber die Bestimmung der Oxalsäure und das Vorkommen von Oxalsäure im Harn	43

HEFT VI.

(Ausgegeben am 19. Juli 1900.)

Jones, Walter. Ueber die Darstellung des Thymins	46
Schultze, Albert. Die Benzoylverbindungen der bei der Spaltung der Eiweisskörper entstehenden Amidosäuren	46
Niebel, W. Ueber das Oxydationsprodukt des Glycogens mit Brom	48
Schwantke, Arthur. Ueber Krystalle aus Taubenblut. Mit Tafel II, Fig. 1—4	48
— — Zur Krystallform des Histidindichlorids. Mit Tafel II, Fig. 5 und 6	49
Münch, A. Ueber das Verhalten einiger künstlicher Hexosen im Thierkörper	49
Salaskin, S., und J. Zaleski. Ueber den Einfluss der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel bei Hunden. Mit zwei Tafeln .	51
Ransom, F. Weiteres über die Lymphe nach Injection von Tetanusgift	55

Die physiologische Wirkung der Protamine und ihrer Spaltungsprodukte.¹⁾

Von

W. H. Thompson,

Professor der Physiologie am Queens College, Belfast.

Mit sieben Abbildungen.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 9. October 1899.)

Die Protamine, deren Kenntniss wir den Arbeiten von Miescher,²⁾ A. Kossel³⁾ und Anderen verdanken, bilden eine Gruppe von eigenartigen Stoffen, die man als die einfachsten Eiweissstoffe betrachten kann. Sie zeigen ausgeprägt basische Eigenschaften und liefern bei hydrolytischer Spaltung nur wenige und relativ einfache Spaltungsprodukte.

Diese Substanzen sind bisher nur aus den männlichen Geschlechtsorganen gewisser Fischarten dargestellt worden; aber man darf kaum bezweifeln, dass durch fortgesetzte Untersuchungen ähnliche oder identische Körper in weiterer Verbreitung in thierischen Geweben aufgefunden werden.

Bisher sind vier Glieder dieser Gruppe mit Sicherheit erkannt worden: 1. das Salmin in den reifen Testikeln des Lachses, von Miescher entdeckt, und das mit diesem höchst wahrscheinlich identische Clupein in denjenigen des Härrings, 2. das Scombrin, von der Makrele erhalten, 3. das Sturin, aus der Milch des Stöhrs gewonnen, und 4. Cyclopterin

¹⁾ Der Inhalt dieser Abhandlung wurde bereits in der Sitzung der physiologischen Section der «British association for the advancement of science» in Dover am 18. September 1899 vorläufig mitgetheilt.

²⁾ Verh. d. naturh. Gesellsch. in Basel, Bd. VI, S. 138. 1874. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 100. 1896.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 176, Bd. XXV, S. 162 u. Bd. XXVI S. 588.

aus dem Sperma von *Cyclopterus lumpus*. Unsere Kenntniss der vier letzteren Körper ist durch die Untersuchungen des Herrn Professor A. Kossel und seiner Schüler gewonnen worden.

Mit stärkeren Spaltungsmitteln behandelt, liefern Salmin, Clupein und Scombrin dieselben Spaltungsprodukte, d. h. 1) Arginin, 2) Amidovaleriansäure und 3) einen kleinen Theil eines unbekannten Restes.

Andererseits weichen Sturin und Cyclopterin in ihrer Zusammensetzung von den obengenannten Körpern ab. Das Sturin liefert 1) Arginin, 2) Histidin, 3) Lysin, 4) Amidovaleriansäure und 5) einen kleinen Theil unbekannten Restes. Das Cyclopterin enthält, wie es scheint, eine aromatische Gruppe.

Die Protamine haben in mehr als einer Hinsicht physiologisches Interesse. Ihre Spaltungsprodukte sind in nicht unerheblicher Menge in derjenigen Substanz enthalten, welche bisher unter dem Namen «Antipepton» in der Litteratur bekannt war.¹⁾ Die physiologischen Eigenschaften des Antipeptons haben die Aufmerksamkeit von mehreren Forschern in Anspruch genommen und auch ich habe diese Untersuchung zunächst im Anschluss an frühere Arbeiten über peptonartige Stoffe unternommen. Die Beobachtungen bezogen sich Anfangs nur auf die physiologische Wirkung der Spaltungsprodukte, welche unter dem Namen «Hexonbasen» bekannt sind, wurden aber später, dem Wunsche des Herrn Professor A. Kossel gemäss, auf die Muttersubstanz derselben, das Protamin, ausgedehnt.

Ueber die Wirkungen der Protamine lagen Beobachtungen von H. Kossel²⁾ vor, welcher feststellte, dass diese Stoffe, bei directer Einführung in den Kreislauf, ziemlich giftig sind.

Alle die obengenannten Protamine, mit Ausnahme des erst vor wenigen Monaten entdeckten und schwer zu beschaffenden Cyclopterins, wurden mit ihren Spaltungsprodukten für die Untersuchungen verwendet und abgesehen vom Scombrin

¹⁾ Fr. Kutscher, Diese Zeitschrift Bd. XXV, S. 195—201; Bd. XXVI, S. 110—122; Bd. XXVIII, S. 88—97.

²⁾ Zeitschrift für Hygiene und Infectiouskrankheiten Bd. 27, S. 44.

wurde das ganze benutzte Material gütigst von Herrn Professor A. Kossel zu meiner Verfügung gestellt. Für dieses und auch für viel freundlichen Rath und gütige Hülfe möchte ich meinem Collegen den aufrichtigsten Dank aussprechen. Das Scombrin habe ich selbst aus Makrelensperma nach seiner Methode dargestellt.

Beschreibung der Versuchsmethode.

Alle Versuche wurden an Hunden ausgeführt. Die Thiere wurden Anfangs mit Morphinum nebst Atropin narcotisirt und später durch eine Mischung von Aether und Chloroform anästhesirt. Die Substanzen (Protamine etc.) wurden aus einer Bürette direct in den Kreislauf eingeführt, und zwar durch eine Canüle, die zu diesem Zweck in die vena femoralis eingebunden war.

Der Einfluss auf den Blutdruck und die Athembewegungen wurde auf der Trommel aufgeschrieben. Für die Registrirung des ersteren bediente ich mich eines gewöhnlichen Quecksilbermanometers. Für die Aufzeichnung der respiratorischen Bewegungen wurden zwei Bert-Marey'sche Tambours mit den nöthigen Schreibeinrichtungen benutzt. Eine derselben schrieb die Brustathmung, die andere die respiratorischen Bewegungen der Bauchwand (diaphragmatische Athmung) auf. Beobachtungen über den Verlauf der Blutgerinnung vor und nach der Einspritzung der Substanz wurden ebenfalls ausgeführt und ausserdem wurde die Zahl der circulirenden Leucocyten festgestellt. Für diese Zwecke wurde aus der Arteria femoralis Blut entnommen.

Die Wirkung der Protamine.

Die Sulfate der verschiedenen Protamine wurden zuerst in Carbonate übergeführt. Nachdem ich mich überzeugt hatte, dass sie frei von allen bei der Darstellung benutzten anorganischen Stoffen waren, wurden die Lösungen auf dem Wasserbad verdunstet und der Rückstand im Exsiccator getrocknet. Ich löste sodann das Protamincarbonat in physiologischer Kochsalzlösung, neutralisirte es durch vorsichtigen

Zusatz verdünnter Salzsäure und verdünnte die Flüssigkeit mit Kochsalzlösung bis zur erforderlichen Stärke, nämlich 1%. Das Protamin wurde also hauptsächlich als Chlorid in den Thierkörper hineingebracht. Vor der Einführung wurde die Lösung auf 37° C. erhitzt.

1. Blutdruck. Eine bedeutende und relativ schnelle

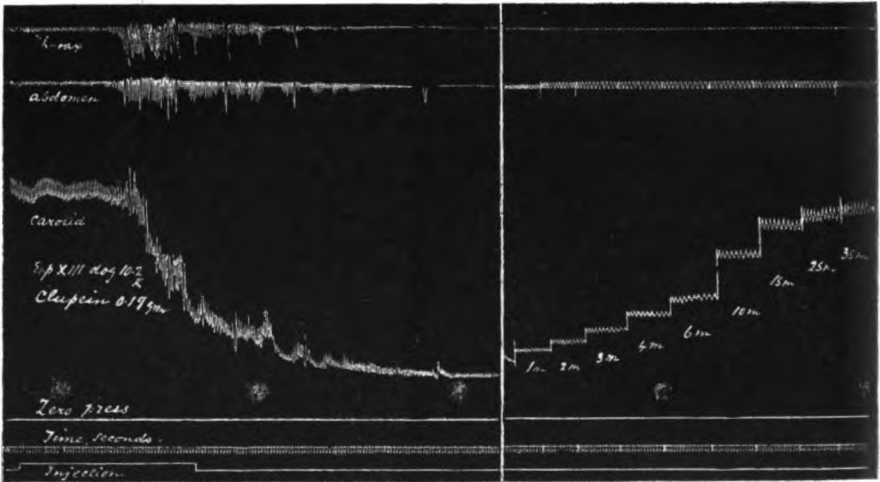


Fig. 1. Wirkung des Clupeins auf Blutdruck und Respiration.

Erniedrigung des Blutdrucks war bald nach dem Eintritt des Protamins in den Kreislauf bemerkbar. Diese führte schnell zum Tode, wenn mehr als eine gewisse Menge Protamin zugeführt worden war. Die tödtliche Dosis erwies sich als sehr klein. Für einen Hund von 10 kg Körpergewicht ergab sich die maximale Quantität des Clupeins, welche auf ein Mal ohne Gefahr hineingebracht werden konnte, als weniger wie 2 dg (15—18 cg). Von Sturin konnte etwas mehr (20—25 cg) injicirt werden. Fig. 1 stellt die Wirkung des Clupeins dar.

Nach einer nichttödtlichen Dosis des Protamins kann der Blutdruck wieder steigen und in der Regel erreicht er dann seinen normalen Stand nach 25—30 Minuten. Wird jetzt eine zweite Dosis gegeben, so erfolgt wiederum ein ähnliches Sinken des Blutdrucks. Diesmal kann man schon eine etwas grössere Menge einführen, ohne dass der Tod eintritt. Es ist also eine

gewisse «Immunität» vorhanden, aber die Grösse dieser Immunität ist relativ gering, viel geringer wie z. B. diejenige, welche eine Einspritzung von Albumose hervorruft, bei gleicher Wirkung in Bezug auf Erniedrigung des Blutdrucks. Fig. 2 zeigt die Wirkung einer zweiten Dosis von Clupein, demselben Versuch wie Fig. 1 entnommen.

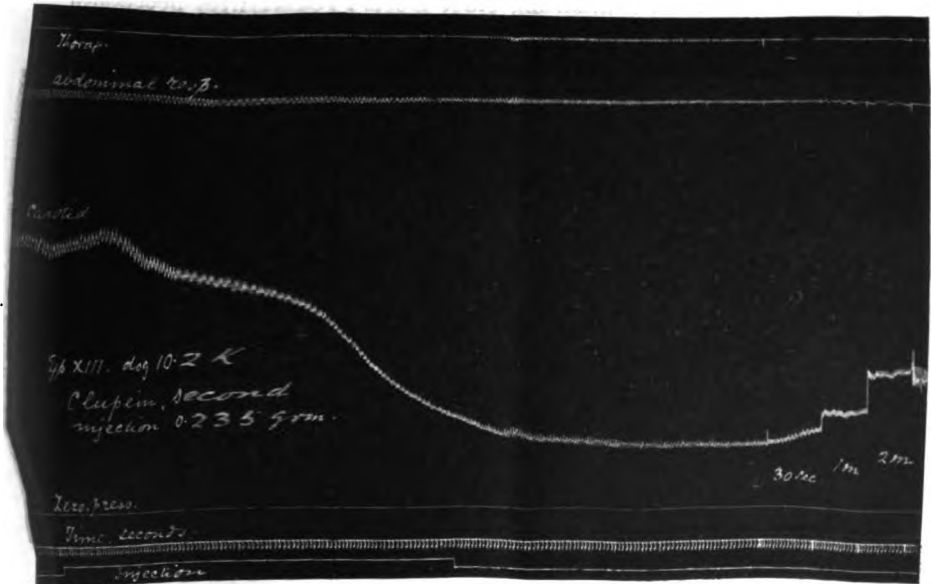


Fig. 2. Wirkung einer zweiten Dosis Clupein.

Andere Protamine lieferten identische Resultate. Die folgende Curve (Fig. 3) ist einem Versuch entnommen, in welchem Sturin injicirt worden war.

Ich habe an anderem Orte¹⁾ gezeigt, dass die vasodilatorische Wirkung der Albumosen hauptsächlich (wenn nicht ausschliesslich) einem peripherischen Einfluss auf die Gefässwandungen zuzuschreiben ist. Es erschien mir deshalb wünschenswerth, zu untersuchen, ob die Protaminwirkung in

²⁾ Journal of Physiology, Vol. XX, p. 455—473, 1896, Vol. XXIV, p. 374—409, 1899, und Vol. XXV, p. 1—21, 1899.

ähnlicher Weise vor sich geht. Ich wandte für diese Untersuchung eine Methode an, die eine Modification der früher von mir benutzten darstellt.

Der linke Splanchnicus wurde frei gelegt, mit Electroden versehen und central durchschnitten. Darauf wurden die Wirkungen einer Reizung gewisser Stärke auf den Blutdruck vor und nach der Einführung einer Dosis Protamins beobachtet. Fig. 4 zeigt die Resultate dieses Versuches.

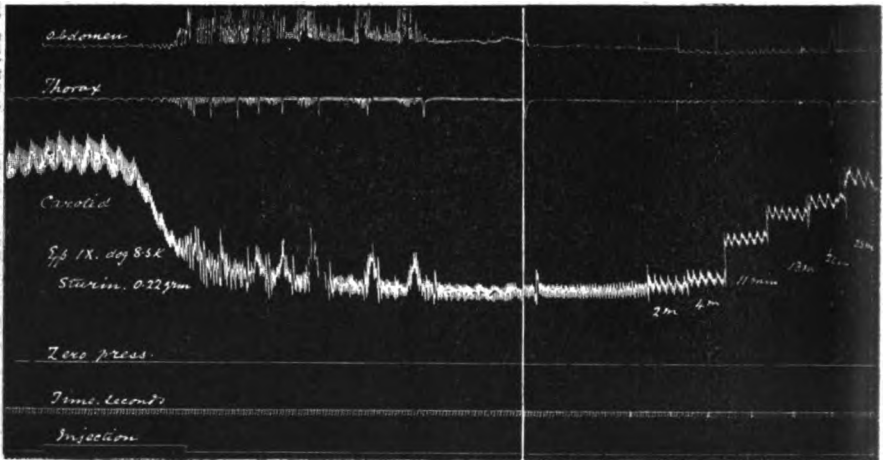


Fig. 3. Wirkung des Sturins auf Blutdruck und Respiration. 1)

Der erste Abschnitt folgender Figur zeigt eine beträchtliche Erhöhung des Blutdrucks als Resultat einer kurzen Reizung des linken Splanchnicus. Der zweite und dritte Abschnitt hingegen zeigt wenig oder keinen Einfluss von derselben Reizung nach Injection des Clupeins. Zwei Minuten später ist in dem vierten Abschnitt eine kleine Erhöhung zu sehen, jedoch als Folge einer stärkeren Reizung, während in dem letzten Abschnitt der Figur die peripherische Erregbarkeit wieder zurückgekehrt ist. Dieses zeigt sich bei einer Reizung von

1) Bei diesem Versuch wurde zur Aufzeichnung der abdominalen Athmung — Marey's Tambour-Cardiograph benutzt — daher gehen hier die Ausschläge nach verschiedenen Richtungen. Bei allen folgenden Versuchen ist der Bert-Marey'sche Apparat angewandt worden.

der ursprünglichen Stärke, 8 Minuten nach der Einführung des Protamins.

Man muss deshalb annehmen, dass die in Rede stehenden Substanzen peripherisch oder mit anderen Worten direkt auf die Wandung der Blutgefäße wirken, in ähnlicher Weise wie die Albumosen. Die Möglichkeit einer Centralwirkung ist trotzdem nicht ausgeschlossen. Um diese Möglichkeit zu erörtern, wurden keine Experimente ausgeführt.

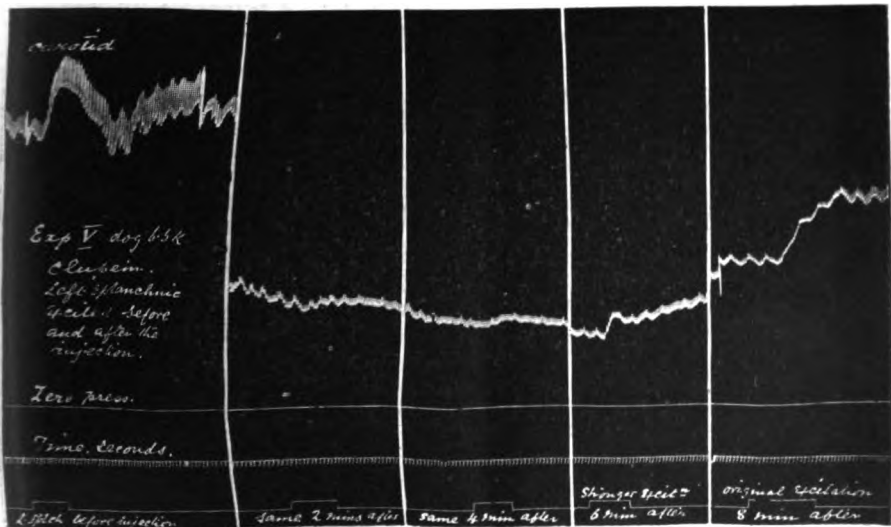


Fig. 4. Zusammenstellung von Abschnitten der beim Versuch V gewonnenen Curve. Wirkung der Reizung des linken Splanchnicus auf den Blutdruck der Carotis vor und zu verschiedenen Zeiten nach einer Einspritzung von Clupein. Zwischen dem ersten und zweiten Abschnitt ist der Blutdruck in Folge der Einspritzung gesunken.

Auch habe ich nicht speciell untersucht, ob diese Substanzen einen direkten schwächenden Einfluss auf den Muskel des Herzens ausüben. Dies ist sehr wahrscheinlich der Fall. In der That scheint es, wie wir gleich sehen werden, als ob alle Arten Muskelgewebe unter dem Einfluss des Protamins mehr oder weniger gelähmt werden.

2. Athmung. Schon bei den ersten Versuchen, die ich mit den Protaminen anstellte, zeigte sich, dass die Athmung von diesen Substanzen in merkwürdiger Weise beeinflusst wird. Wo in Folge der Einführung zu grosser Mengen des

Protamins der Tod eintrat, war er direkt der Aufhebung der Athembewegungen zuzuschreiben und durch künstliche Respiration zu verhindern; vorausgesetzt, dass die eingeführte Quantität die maximale nichttödliche Dosis nicht zu bedeutend überschritt. Wurden bei Eingabe nichttödlicher Dosen die Respirationscurven aufgeschrieben, so bemerkt man zugleich mit dem Sinken des Blutdrucks eine Vergrößerung und Beschleunigung der Athembewegungen, und zwar ebenso wohl der thorakalen wie der Bauchathmung. Dieses ist in der folgenden, übrigens auch in anderen Figuren, ersichtlich.

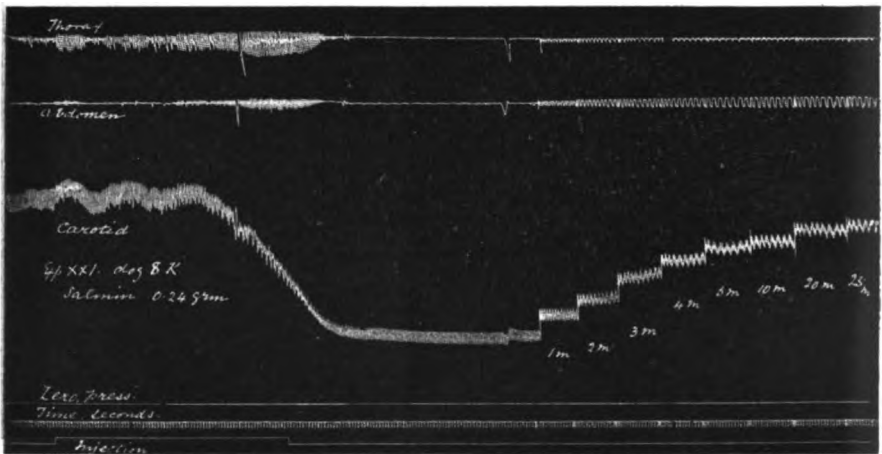


Fig. 5. Einfluss des Salmins auf die respiratorischen Bewegungen und den Blutdruck

Auf diese Vertiefung und Beschleunigung folgt eine Periode der Ruhe, welche in völligen Stillstand übergeht, und zwar werden in diesem Stadium Brust- und Bauchathmung in gleicher Weise beeinflusst. Nach einiger Zeit ist der allmähliche Wiederbeginn der Bauchathmung bemerkbar, deren Bewegungen immer tiefer und langsamer werden. Active Bewegungen der Brust bleiben aus, solange die Wirkung des Giftes dauert. Freilich sind Bewegungen der Brustwand in dieser dritten Periode öfters zu sehen. Aber sie sind rein passiver Natur, wie der Augenschein lehrte und wie verschiedene Curven deutlich zeigen. An diesen abdominalen

Athembewegungen war nicht nur das Zwerchfell, sondern auch die Muskulatur der Bauchwand betheiligt.

Wenn nun während der Periode der vergrößerten abdominalen Athmung eine zweite Portion des Protamins injicirt wurde, so wurden die Bewegungen allmählich kleiner und kleiner und geriethen endlich in völligen Stillstand. Aus solch einem Zustand war die Wiederherstellung des Thieres unmöglich. Fig. 2 illustriert eine derartige Wirkung der zweiten injicirten Dosis.

Diese Veränderungen der Athmung sind schwer zu erklären. Die scharfe Trennung zwischen den beiden Muskelfunctionen, der Erhebung der Brustwand und der Senkung des Zwerchfells, deren eine gelähmt, deren andere compensatorisch vergrößert ist, scheint auf eine centrale Wirkung zu deuten. Andererseits habe ich keinen Zweifel daran, dass die Protamine einen peripherischen Einfluss auf die quergestreifte Muskulatur ausüben, ähnlich wie auf die glatten Muskelfasern der Gefäßwandungen. Hierüber sind die Versuche noch nicht abgeschlossen; doch möge erwähnt sein, dass ich, wenn die Substanz auf dem Höhepunkt ihrer Wirkung war, beobachten konnte, wie die Glieder der Versuchsthiere schlaff waren und dass die Muskulatur derselben weder willkürlich noch reflectorisch in Thätigkeit versetzt werden konnte.

3. Blutgerinnung. Dieser Vorgang wird durch Protamin auch beeinflusst, und zwar stets verlangsamt (nach privaten Mittheilungen schon von H. Kossel beobachtet). Eine einzige Dosis Protamin hatte in dieser Hinsicht nur wenig Wirkung, aber nach einer zweiten und viel mehr noch nach einer dritten wurde die Gerinnung öfters für 36 Stunden verzögert, sie blieb indes nie ganz aus. Das Nähere ist aus beifolgender Tabelle (Seite 10) ersichtlich.

Eine ähnliche Verzögerung der Gerinnung wurde hervorgerufen, wenn man etwas Blut in ein Reagensglas, das etwas Protaminlösung enthielt, hineinbrachte. In der Regel wurden drei Eprovetten genommen, deren jede einige Cubikcentimeter einer 1%igen Protaminlösung enthielt. In diese wurden verschiedene Blutmengen gebracht. In vielen Fällen war im

Tabelle I. Einfluss der Prolamine auf die Blutgerinnung.

Versuchs- Nummer	Körper- gewicht in Kilo	Injizierte Substanz	Quantität, eingeführt in Grammen	Normale Gerinnungszeit	Gerinnungszeit nach der ersten Injection	Gerinnungszeit nach der zweiten Injection	Bemerkungen
III	4,7	Clupein	(b) 0,142 (a) 0,185	8 Min. 10 Sec.	44 Min. 30 Sec.	nicht beobachtet	Hund ging zu Grunde
IV	10,45	,	(a) 0,179 (b) 0,152	13 , 40 ,	29 , 30 ,	nicht an demselben Tage	, , , ,
V	6,5	,	nicht notirt	11 , 35 ,	nicht in 30 Min.		
XII	11,0	,	(a) 0,248 (b) 0,303	10 , 15 ,	Gallertartig 63 Min. 30 Sec. Fet 123 , 30 ,	nicht an demselben Tage	, , , ,
XIII	10,2	,	(a) 0,190 (b) 0,235	12 , 20 ,	35 Min. 20 Sec.	Gallertartig nach 25 Min. 30 Sec.	, , , ,
XXII	9,5	"	0,25	9 , 10 ,	nicht in 40 Min.		, , , ,
XXV	6,0	,	0,21	10 , 0 ,	, , 70 ,		Hund blieb lebend
VII	11,5	Sturin	(a) 0,187 (b) 0,216	19 , 45 ,	45 Min. 50 Sec.	am nächsten Morgen	, , , ,
VIII	7,5	,	0,5	18 , 40 ,	am zweiten Morgen		Hund ging zu Grunde
IX	8,5	,	(a) 0,22 (b) 0,262	9 , 18 ,	39 Min. 50 Sec.	nur weich am nächsten Morgen	Hund blieb lebend
XV	5,1	,	(a) 0,115 (b) 0,182	11 , 10 ,	37 , 45 ,	am nächsten Morgen	, , , ,
XVI	5,2	Scombrin	0,133	18 , 35 ,	weich 192 Min. 30 Sec. fest am nächsten Morgen		, , , ,

NB. (a) bedeutet erste, (b) zweite Dose.

ersten Reagensglas ein Theil Blut dem gleichen Volumen der Lösung, im zweiten zwei Theile Blut und im dritten drei Theile Blut je einem Theil der Lösung beigemischt. Die Mischungsverhältnisse wurden aber bei den verschiedenen Versuchen geändert. Der erste Erfolg war ein Hellerwerden der Blutfarbe, zu gleicher Zeit war zu bemerken, dass das Blut in dünnen Schichten ein körniges Aussehen zeigte. Bei mikroskopischer Betrachtung erwiesen sich diese Körnchen als zusammengesetzt aus Klümpchen rother Körperchen, welche zusammenklebten und etwas gekrümmt waren. Bald trat eine schnelle Senkung der rothen Körperchen ein und eine schöne klare Schicht von Blutplasma erschien über dem Bodensatz.

Der Grad der Gerinnungsverzögerung wechselt mit der Menge der Protaminlösung. Bei Mischung gleicher Theile beider Flüssigkeiten dauert sie über Nacht und es war bei solchen Versuchen am nächsten Morgen nur eine sehr unvollkommene Gerinnung zu bemerken. Mit einem Verhältnisse von einem Volumen der Protaminlösung zu zwei Volumina Blut war die Gerinnung meistens während der Nacht eingetreten und ein festes Gerinnsel war am nächsten Morgen vorhanden. Die Versuche wurden immer Nachmittags ausgeführt. Bei einem Mischungsverhältniss von einem zu drei Theilen wurde die Coagulation nur 3 bis 4 Stunden verzögert.

Man bemerkte in allen Fällen, dass die untere Schicht der rothen Blutkörperchen eine beträchtliche Zeit vor der oben befindlichen Schicht Blutplasmas geronnen war.

Im Reagensglas zerstört die Protaminlösung die Leucocyten nicht, auch war keine wesentliche Veränderung an diesen Körperchen selbst zu sehen.

4. Zahl der Leucocyten im Kreislauf. Unter dem Einfluss der Protamine war eine sehr bedeutende Verminderung der Anzahl der circulirenden Leucocyten zu constatiren. Ihr Verschwinden stand im Allgemeinen in einem gewissen Zusammenhang mit dem Grad der Gerinnungshemmung. Doch kann man nicht gerade behaupten, dass die beiden Vorgänge parallel laufen. Die Einzelheiten sind in der folgenden Tabelle

gegeben, und zwar für Versuche mit den verschiedenen Protaminen.

Tabelle 2. Einfluss der Protamine auf die Zahl der circulirenden Leucocyten.

Versuchs- Nummer	Körper- gewicht in Kilo	Injicirte Substanz	Quantität eingeführt in Gramm	Normalzahl der Leucocyten	Zahl nach der 1. Injection	Zahl nach der 2. Injection
XII	11,0	Clupein	{ (a) 0,248 (b) 0,303	16675	2656	Nicht beobachtet
XIII	10,2	„	{ (a) 0,190 (b) 0,235	11875	3906	1719
XXV	6,0	„	{ (a) 0,22 (b) 0,252	8190	687	Nicht beobachtet
IX	8,5	Sturin	{ (a) 0,115 (b) 0,182	10000	10000	5937
XV	5,1	„	{ (a) 0,152 (b) 0,230	28281	1875	781
XX	7,0	Salmin	{ (a) 0,24 (b) 0,262	18750	5469	Nicht beobachtet
XXI	8,0	„	{ (a) 0,133 (b) 0,133	17344	7344	4062
XVI	5,2	Scombrin	{ (a) 0,133 (b) 0,133	22812	1562	Nicht beobachtet

NB. (a) bedeutet erste und (b) zweite Dose.

Die Verminderung der circulirenden Leucocyten kann kaum auf Zerstörung derselben zurückgeführt werden, denn in vitro ist ja eine Auflösung nicht zu beobachten. Dafür spricht auch eine Beobachtung, die ich in Versuch XXV machte. Hier erreichte die Zahl der Leucocyten $\frac{3}{4}$ Stunde nach der Einführung des Protamins einen etwas höheren Stand wie vorher, zugleich war auch die Geschwindigkeit der Gerinnung wieder die ursprüngliche. Ein so schnelles Wiedererscheinen der Leucocyten wäre nicht denkbar, wenn die injicirten Stoffe sie zerstört hätten.

Ehe wir das Gebiet der Protamine selbst verlassen, mögen noch einige Worte über den Unterschied ihrer physiologischen Wirkung gesagt sein. Clupein und Salmin sind in chemischer Zusammensetzung identisch und Scombrin steht ihnen sehr nahe. Alle diese zeigten keine wahrnehmbaren

Unterschiede in ihrer physiologischen Wirkung. Sturin hingegen erschien etwas minder giftig. Ein Blick auf Tabelle 1 zeigt, dass — mit Ausnahme eines Versuches — die Thiere nach Sturineinspritzung am Leben blieben, und doch waren die Dosen in den meisten Fällen so hoch bemessen, dass Clupein oder Salmin in diesen Mengen sicher tödtlich gewirkt hätten.

Dieses ist von Interesse, weil das Sturin, wie Herr Professor A. Kossel gezeigt hat, in seiner Zusammensetzung den gewöhnlichen complexen Eiweisskörpern etwas näher steht als Salmin, Clupein und Scombrin.

Wirkung der Spaltungsprodukte.

a. Die Protone. Die nächsten Umwandlungsprodukte, welche durch Hydrolyse aus den Protaminen hervorgehen, sind die «Protone». ¹⁾ Dieselben sind in Wasser leichter löslich wie die Muttersubstanzen und geben in alkalischer Lösung keine Fällung mit Eiweiss oder Propepton. Es war von vornherein nicht unwahrscheinlich, dass die Protone sich auch in ihren physiologischen Wirkungen von den Protaminen unterscheiden würden. Demgemäss stellte ich etwas Protonsulfat aus Clupeinsulfat durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure nach der Vorschrift von A. Kossel dar. Das Sulfat führte ich in Carbonat über und injicirte es in gleicher Weise wie vorher die Protamine; das heisst: das Carbonat wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und dann mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure vor der Injicirung neutralisirt.

Drei Versuche wurden mit Clupeinproton ausgeführt und in allen waren ausgeprägte Abweichungen von der Wirkung eines Protamins zu constatiren. Der Hauptunterschied war der, dass eine viel grössere Menge und zwar fast dreimal so viel als die tödtliche Dose des Clupeins eingeführt werden konnte, ohne dass die bedrohlichen Erscheinungen eintraten. Also $\frac{1}{2}$ g erzeugt in einem 8 kg schweren Hund nicht mehr als eine kleine Erniedrigung des Blutdrucks. Die Athmung wurde

1) A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 174.

auch nur sehr wenig beeinflusst, die Blutgerinnung war kaum verzögert und die Zahl der circulirenden Leucocyten nur wenig verringert. Fig. 6 gibt die Curve von einem dieser Versuche an.

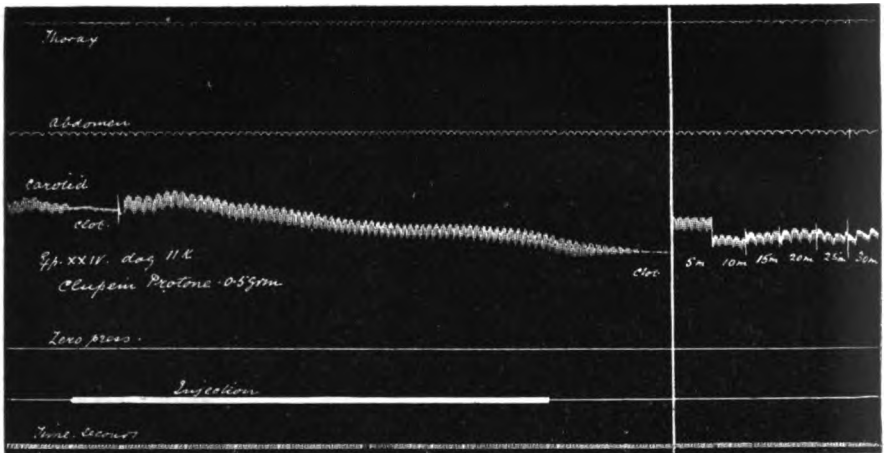


Fig. 6. Wirkung des Clupeinprotons auf Athembewegungen und Blutdruck.

Eine zweite Dose Proton ruft eine noch geringere Blutdruckerniedrigung hervor, aber meist verursacht sie Stillstand der Brustathmung. Die Blutgerinnung erweist sich auch verlangsamt und die Zahl der Leucocyten ist vermindert. Aber diese zwei letzteren Erscheinungen sind nie so ausgesprochen wie bei den Protaminen.

Die gerinnungshemmende Wirkung ist aus folgenden Zahlen ersichtlich, welche als Durchschnitt aus drei Versuchen dienen:

Normale Gerinnungszeit	9	Mim.	7	Sec.
Nach der ersten Protoninjection . .	18	>	27	>
Nach der zweiten Protoninjection .	27	>	32	>

Der Einfluss auf die Zahl der Leucocyten ergibt sich aus der folgenden Zusammenstellung. Die Ziffern stellen Mittelzahlen aus zwei der oben angeführten Versuche dar:

Normale Zahl der Leucocyten . . .	pro	cmm.	12,475
Zahl nach erster Protoninjection . .	>	>	11,395
Zahl nach zweiter Protoninjection . .	>	>	2,140.

Somit folgt, dass die Protamine bei ihrer Umwandlung in Protone ihre giftigen Eigenschaften im Wesentlichen verlieren.

b. Die Hexonbasen. Diese Körper gehen, wie schon oben erwähnt, durch tiefergreifende hydrolytische Spaltung aus den Protaminen hervor. Man bezeichnet als Hexonbasen: Arginin, Histidin und Lysin. Ich prüfte ihre physiologischen Wirkungen in derselben Weise wie die der Protamine.

Argininnitrat wurde in Carbonat umgewandelt, in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und diese Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure neutralisirt. Histidin und Lysin wurden in Form der Chloride dargestellt. Die Reaction dieser Salze ist sauer. Nach der Lösung in normaler Kochsalzlösung wurde ihre Acidität durch Zusatz von Natriumcarbonatlösung aufgehoben.

Keine von diesen Basen zeigt irgend einen Einfluss auf Blutdruck oder auf Respiration. Arginin und Histidin beschleunigten ein wenig die Gerinnung des Blutes. Dieses ist von Interesse im Hinblick auf die Thatsache, dass das Anti-pepton nach Einführung in den Kreislauf ebenfalls die Blutgerinnung beschleunigt.¹⁾ Lysin scheint keinem Einfluss darauf zu haben. Das Arginin beschleunigt auch im Reagensglase ein wenig die Blutgerinnung, das Histidin thut es in viel höherem Grade.

In einem Versuch verminderte das Arginin die Zahl der Leucocyten von 12031 bis 4219 pro cmm., das Lysin nach zwei Injectionen von 16094 bis 11562. Histidin war ohne Einfluss.

Die Anzahl der Versuche, welche mit diesen Basen ausgeführt wurden, konnte nur eine sehr kleine sein, da die Darstellung von grösseren Mengen Schwierigkeiten macht, während doch die für den Versuch erforderlichen Substanzmengen viel grösser waren wie bei den Protaminversuchen. Für jeden Versuch wurden 2 g der erwähnten Basen angewandt. Mit Arginin wurden drei Versuche ausgeführt, mit Histidin und Lysin je einer.

¹⁾ Thompson op. cit., Spiro u. Ettinger, Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 121, 1897. Chittenden, Mendel, Henderson, American Journal of Physiology II, p. 142, 1899.

Dennoch haben die Versuche entschieden gezeigt, dass die giftigen Eigenschaften der Protamine in keiner der Hexonbasen wieder zu finden sind.

Daneben wurden auch Beobachtungen über den Einfluss des Arginins, Histidins und Lysins auf die Harnabsonderung angestellt. Die Resultate sollen in einer späteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben.

c. Der Rückstand: Es blieb nun noch die Frage, ob die eigenartigen physiologischen Wirkungen nicht vielleicht dem Rückstand, welcher nach Abspaltung der Hexonbasen aus dem Protamin hinterbleibt, angehören. (In dem «Rückstand» ist auch die schon oben erwähnte Amidovaleriansäure einbegriffen).

Für diese Untersuchung wurde Clupeinsulfat in folgender Weise verarbeitet:

Dasselbe wurde am Rückflusskühler 8 Stunden mit dem dreifachen Volumen einer Schwefelsäure, welche auf 1 Volumtheil concentrirte Schwefelsäure 2 Volumtheile Wasser enthielt, gekocht. Nachdem die Hauptmenge der Schwefelsäure durch Baryt entfernt war, wurde das Arginin durch Silbersulfat und Baryt nach der Methode von A. Kossel ausgefällt, das Filtrat durch Schwefelsäure vom überschüssigen Baryt, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und zuletzt die überschüssige Schwefelsäure vollkommen durch die erforderliche Menge Baryt entfernt.

Der so gewonnene eingedampfte «Rückstand» war sehr hygroskopisch. Von der trockenen Substanz führte ich 0,37 g in der oben beschriebenen Weise in den Kreislauf eines Hundes ein. Um die oben angegebene Menge zu gewinnen, musste selbstverständlich eine bedeutend grössere Menge Protamin verarbeitet werden. Wenn nun die wirksame Atomgruppe in dem «Rückstand» vorhanden wäre, so müssten seine giftigen Eigenschaften viel stärker sein wie diejenigen des Protamins. Dies war aber nicht der Fall. Im Gegentheil war er ohne deutliche physiologische Wirkungen gefunden, mit Ausnahme eines sehr leicht erhöhenden Einflusses auf den Blutdruck.

Die toxischen Wirkungen der Protamine müssen deshalb in seiner Constitution im Ganzen gesucht werden, und nicht etwa in einer derjenigen Atom-

gruppen, die wir unter den Spaltungsprodukten vorfinden. Schon die Hydratation bewirkt, wie wir gesehen haben, eine wesentliche Verminderung der Toxicität.

Physiologische Wirkung des Histons.

Bekanntlich kann durch Extraction gewisser zellenreicher Gewebe, z. B. der Thymusdrüse des Kalbes,¹⁾ ein Eiweisskörper mit ausgeprägt basischen Eigenschaften gewonnen werden. Diesem Körper gab A. Kossel, der es zuerst in den rothen Blutkörperchen der Gans auffand, den Namen Histon. Liliensfeld²⁾ hat seinen Einfluss auf die Blutgerinnung studirt. In Anbetracht seiner Beziehungen zum Protamin erschien es wünschenswerth, die Wirkung dieses Eiweisskörpers auf den thierischen Organismus mit derjenigen der Protamine zu vergleichen. Ich stellte demgemäss etwas von dieser Substanz aus frischem Kalbsthymus dar und führte damit einige Versuche aus.

Seine Wirkung erwies sich derjenigen des Protamins sehr ähnlich. Die folgende Curve gibt ein Bild von der Wirkung des Histons:

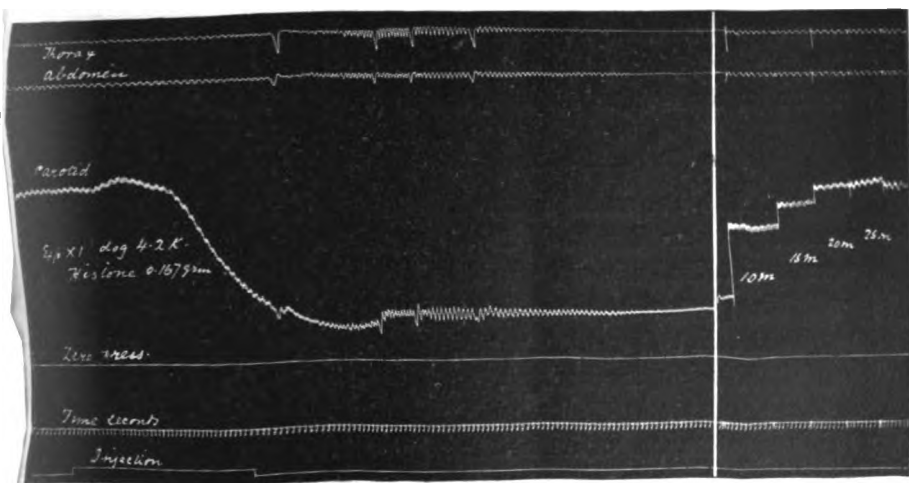


Fig. 7. Wirkung des Histons auf Blutdruck und Athembewegungen.

1) Liliensfeld, Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 473 ff. 1894.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 89. 1895.

Der Blutdruck erleidet eine starke Herabsetzung, während die Athembewegungen in einer sehr ähnlichen Weise wie durch Protamin beeinflusst wurden. Auch erwies sich die Blutgerinnung bei einem der Experimente verzögert und ebenso war die Anzahl der im Kreislauf befindlichen Leucocyten erheblich vermindert. Die Gerinnungszeiten waren bei beiden Versuchen die folgenden:

	Normale Gerinnungszeit.	Nach der ersten Injection.	Nach der zweiten Injection.
(1)	10 Min. 30 Sec.	8 Min. 20 Sec.	Gallertartig 85 Min.
(2)	7 „ 30 „	15 „ 55 „	7 Min. 40 Sec.

Die Zahl der Leucocyten war folgende:

	Normal.	Nach der ersten Injection.	Nach der zweiten Injection.
(1)	13437	313	131
(2)	16094	2006	469

Das Gewicht des Hundes im ersten Versuch war 7,2 kg., und die zwei betreffenden Dosen 15 und 30 cg. Im zweiten Versuch war das Gewicht des Thieres 4,2 kg. und die Dosen 16,7 und 29,8 cg.

Es ist mir nicht unwahrscheinlich, dass einige der Resultate, welche viele Forscher nach Einspritzung von Extracten thierischer Organe erhalten haben, durch die Anwesenheit von Histon in ihren Injectionsflüssigkeiten zu erklären sind.¹⁾

Zusammenfassung der Hauptresultate.

1. Die Protamine besitzen deutlich giftige Wirkung. Sie erniedrigen den Blutdruck stark, verzögern die Blutgerinnung, vermindern die Zahl der im Kreislauf anwesenden Leucocyten — und üben endlich einen eigenthümlichen Einfluss auf die respiratorischen Functionen aus.

2. Die Blutdruckerniedrigung kann erklärt werden durch peripherischen oder direkten Einfluss auf die Gefässwände; freilich ist es auch wahrscheinlich, dass eine Schwächung des Herzens eine Rolle bei ihrem Zustandekommen spielt.

¹⁾ Schäfer and Vincent, The physiological Effects of Extracts fo the Pituitary Body, Journal of Physiology, Vol. XXV, p. 94. 1899.

3. Die Wirkung auf die Athmung darf auch mindestens zum Theil einem direkten Einfluss auf die willkürliche Athemmuskulatur zugeschrieben werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass daneben noch eine centrale Wirkung in Betracht kommt.

4. Wenn die Protamine durch Hydrolyse in Protone übergeführt werden, so sind die giftigen Eigenschaften sehr vermindert.

5. Die letzten Spaltungsprodukte: die Hexonbasen und der daneben bleibende chemisch noch nicht völlig bekannte Rückstand besitzen überhaupt keine giftigen Eigenschaften. Diese müssen daher in der Constitution des gesammten Protaminmoleküls begründet sein.

Ehe ich diese Mittheilung schliesse, muss ich dem Herrn **Dr. Plenge**, Assistenten am physiologischen Institut zu Marburg, für die werthvolle Hülfe bei der Ausführung der hier beschriebenen Versuche meinen aufrichtigen Dank ausdrücken.

Ueber das Thymin.

Von

Walter Jones.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 20. Oktober 1899.)

Das Thymin wurde zuerst von A. Kossel und Neumann¹⁾ beschrieben, welche diese Substanz bei der Hydrolyse der Nucleinsäure aus Thymusdrüse mit mässig concentrirter Schwefelsäure gewannen. Dieselben Verfasser zeigten dann, dass dieser Körper auch aus den Nucleinstoffen der Hefe und der Rindermilz hervorgeht.²⁾ Miescher³⁾ fand ihn später unter den Zersetzungsprodukten der Nucleinsäure des Lachsspermas. Fügen wir nun hinzu, dass das Thymin auch aus den Spermatozoen des Störs⁴⁾ und des Herings⁵⁾ dargestellt worden ist, so werden wir zu der Annahme geführt, dass hier ein Körper von allgemeiner Verbreitung vorliegt. A. Kossel⁶⁾ hat diese Thymingruppe als ein charakteristisches Merkmal gewisser Nucleinstoffe angesehen, welche er unter dem Namen «Thymonucleinsäuren» von denjenigen Nucleinstoffen abtrennt, die diese Gruppe nicht enthalten.

Die Constitution des Thymins ist noch völlig unerforscht, doch liegt wegen des niedrigen Wasserstoffgehalts der Gedanke nahe, dass es eine cyklische Structur besitzt. Man wird ins-

1) A. Kossel und A. Neumann, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXVI, S. 2754.

2) A. Kossel und A. Neumann, ibid., Bd. XXVII, S. 2217.

3) F. Miescher, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 124.

4) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 189.

5) Wl. Gulewitsch, ibid., Bd. XXVII, S. 292.

6) A. Kossel, Nucleinstoffe in Liebreich's Encyclopädie, Bd. III.

besondere die Annahme erwägen müssen, ob nicht in dem Thymin ein Derivat der Pyrimidingruppe vorliegt, zumal auf diese Weise das Thymin in Beziehung gesetzt würde zu den Nucleinbasen, die als «Alloxur-» oder «Purin»-Derivate ebenfalls den Pyrimidinkern enthalten.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend habe ich einige Versuche zur Aufklärung der Constitution des Thymins begonnen. Ich habe zunächst die Einwirkung des Broms auf Thymin studirt und hierbei ein charakteristisches Substitutionsprodukt erhalten, welches den Ausgangspunkt für meine weiteren Untersuchungen bilden soll.

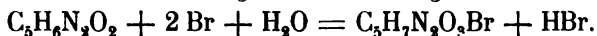
Bromthymin $C_5H_7N_2O_3Br$.

Nachdem ich verschiedene Methoden versucht hatte, welche nur Mischungen von Thymin und Bromthymin lieferten, ergab sich das folgende einfache Verfahren zur Bromirung als das beste. Man bringt eine kleine Menge Thymin mit einer zur Lösung ungenügenden Menge heissen Wasser in ein Becherglas und giesst unter Umrühren Bromdampf aus einer Flasche mit Brom hinzu, solange die Bromdämpfe von der Flüssigkeit aufgenommen werden und bis eine dauernd gelbe Färbung der Flüssigkeit eintritt. Jetzt fügt man mehr Wasser hinzu, erhitzt die Lösung, lässt von neuem Bromdämpfe hineinfließen, bis die Flüssigkeit wieder dauernd gelb bleibt, und wiederholt diese Operation solange, bis alles Thymin in Lösung gegangen ist. Die Aufnahme des Broms geht so prompt vor sich, dass bei einiger Vorsicht das Thymin vollkommen umgewandelt werden kann, ohne einen Ueberschuss von Brom hinzuzufügen oder mehr heisses Wasser anzuwenden, als zur Lösung unbedingt notwendig ist. Wenn diese Lösung erkaltet, scheidet sich das Reactionsprodukt in langen, concentrisch angeordneten, durchsichtigen Prismen aus. Man krystallisirt den Körper um aus heissem (nicht kochendem) Wasser, bis der Geruch nach Brom verschwunden ist. Wenn das Thymin rein ist und das Brom vorsichtig zugefügt wird, so scheidet sich die ganze Menge bei der ersten Krystallisation aus und bedarf kaum noch weiterer Reinigung.

Das so erhaltene Produkt ist eine farb- und geruchlose, krystallinische Substanz, welche sich im Wasser bedeutend

leichter löst, als Thymin. Wenn es aus einer heissen, concentrirten Lösung krystallisirt, so bildet es Aggregate von Nadeln oder feinen Prismen, die in einigen Fällen von Pyramidenflächen begrenzt sind; wenn es aber aus einer kalten Lösung durch langsame Verdunstung niedergeschlagen wird, so bildet es kräftige, einzelne Prismen und runde Formen. Plötzlich erhitzt, schmilzt es zu einer rothbraunen Flüssigkeit, welche sich im Abkühlen verdickt, und ein krystallinisches Sublimat bildet sich an den kälteren Theilen der Röhre, in der erhitzt wird. Wenn es hingegen bei der Bestimmung des Schmelzpunktes langsam erhitzt wird, wird es bei 130° gelb und gibt Bromdämpfe ab, sowie die Temperatur auf 150—160° steigt. Der Rückstand jedoch ist bei 270° noch nicht geschmolzen.

Zieht man die Zusammensetzung des Thymins selbst in Betracht und die Leichtigkeit, mit welcher es im diffusen Tageslicht Brom aufnimmt, so sollte man erwarten, dass die Substanz 2 Atome Brom addirt, wie jede ungesättigte Verbindung unter diesen Umständen thun würde. Die Ergebnisse der Analysen, die weiter unten angeführt werden, zeigen jedoch, dass dies nicht der Fall ist, sondern dass eine einfache Substitution und zugleich eine Hydratation stattfindet, sodass ein Körper von der Zusammensetzung $C_5H_7N_2O_2Br$ entsteht. Verfolgt man die Reaction quantitativ, so ergibt sich aus dem Verhältniss des umgesetzten Thymins zu dem entstehenden Bromthymin, dass die Reaction nur nach folgender Gleichung verlaufen kann:



Diese quantitative Umwandlung gibt einen fast sicheren, wenn auch vielleicht überflüssigen Beweis dafür, dass das Thymin ein chemisches Individuum ist.

Die Analysen der dreimal aus heissem Wasser umkrystallisirten und im Exsiccator getrockneten Substanz ergaben folgende Werthe:

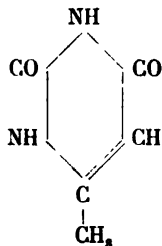
- | | | | | | |
|------|-------------------|-------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| I. | 0,3029 g Substanz | gaben | 0,2964 g CO_2 | und | 0,0880 g H_2O . |
| II. | 0,2727 „ | „ | 0,2680 „ CO_2 | „ | 0,0756 „ H_2O . |
| III. | 0,2201 „ | „ | 0,1837 „ AgBr. | | |
| IV. | 0,2326 „ | „ | 0,1949 „ AgBr. | | |
| V. | 0,2374 „ | „ | 25,1 ccm. N | bei 7° C. und unter einem | |
| | | | Barometerdruck von 752 mm. gemessen. | | |

VI. 0,2421 g Substanz gaben 25,6 ccm. N bei 7,25° C. und unter einem Barometerdruck von 756 mm. gemessen.

Berechnet für	Gefunden:					
$C_5H_7N_2O_2Br$:	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
C 26,92%	26,69%	26,80%				
H 3,14%	3,23%	3,08%				
Br 35,85%			35,56%	35,70%		
N 12,56%					12,65%	12,75%
O 21,53%						
100,00%						

Der Mehrgehalt des Bromproduktes an Wasserstoff und Sauerstoff gegenüber dem Thymin ist nicht etwa auf Krystallwasser zu beziehen, denn die Substanz fängt schon an, sich zu zersetzen, ehe sie eine Gewichtsabnahme zeigt. Dies ergibt sich beim Erhitzen im Luftbade. Thymin muss demgemäss als ein Anhydrid angesehen werden.

Zum Schluss will ich nicht unerwähnt lassen, dass Behrend¹⁾ auf synthetischem Wege einen Körper von der Zusammensetzung des Thymins dargestellt hat. Dieses Produkt — Methyluracil — besitzt folgende Constitution:



Nach der Beschreibung Behrend's kann das Methyluracil mit dem Thymin nicht identisch sein. Es nimmt ebenso wie Thymin ein Atom Brom auf,²⁾ doch tritt hierbei keine Hydratation ein, vielmehr entspricht das Bromderivat der Formel $C_5H_5BrN_2O_2$.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Kossel meinen Dank auszusprechen, auf dessen Veranlassung ich diese Arbeit unternommen habe und unter dessen Leitung ich sie fortzusetzen gedenke.

1) Annalen der Chemie und Pharmacie **229**, 8. (1885).

2) Ibid. **229**, 17; **231**, 249.

Zur Kenntniss der Schwefelausscheidung bei Säuglingen.

Von

Dr. Walther Freund,
Volontär-Assistenten der Klinik.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik zu Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 23. Oktober 1899.)

Da bisher Untersuchungen über die Ausscheidung der schwefelhaltigen Verbindungen im Harn von Säuglingen noch nicht vorliegen, so scheint es mir gerechtfertigt, bevor ich im Folgenden über eine Anzahl solcher Untersuchungen berichte, kurz auf die Gesichtspunkte hinzuweisen, unter denen — nach den aus der Lehre vom Erwachsenen und vom Thierversuche her bekannten Thatsachen — die Ausscheidung der schwefelhaltigen Stoffwechselprodukte beim Säugling von Interesse erscheint, und was für Erwartungen wir an die Ergebnisse darauf gerichteter Untersuchungen für die Pathologie des Säuglingsalters setzen dürfen.

Durch eine Reihe aus dem Laboratorium der Breslauer Kinderklinik hervorgegangener Arbeiten haben wir eine bei magendarmkranken Säuglingen auftretende Stoffwechselstörung kennen gelernt, bei der höchst wahrscheinlich die verminderte Oxydationsfähigkeit des erkrankten Organismus eine wesentliche Rolle spielt. Soweit sich nun das Vorhandensein von Produkten der unvollständigen Oxydation aus der Erhöhung der Ammoniakausscheidung erschliessen lässt, entstammen dieselben fast ausschliesslich dem Fett und gewissen Kohlehydraten der Nahrung; nur in vereinzelter Fällen konnte durch eine Eiweissernährung erhöhte Ammoniakausscheidung hervorgerufen werden

Nach den Ausführungen Keller's (1) ¹⁾ sind auch die sonstigen bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen nicht im Stande gewesen, die Schädlichkeiten einer eiweissreichen Ernährung, die uns als klinische Thatsache am Krankenbette von Tag zu Tag immer wieder entgegentreten, in exacter Weise zu begründen. Um so wünschenswerther wäre es, die Frage zu entscheiden: Erstreckt sich in der That bei den magendarmkranken Säuglingen die Störung des Oxydationsvermögens nicht auf das Eiweiss der Nahrung, oder lässt uns hier nur unser Indicator, die Steigerung der Ammoniakausscheidung, im Stich, etwa weil hier die Produkte der unvollständigen Verbrennung keine Säuren sind?

Von jeher hat nun die Ausscheidung des sogenannten neutralen Schwefels in ihrem Verhältniss zur Gesamtschwefelausscheidung als ein Massstab für die Intensität der Oxydationsvorgänge gegolten, dessen sich die Autoren zur Beantwortung der verschiedensten Fragen in dem Sinne bedienten, dass sie in einer relativen Steigerung der Neutralschwefelmengen im Harn das Zeichen einer Herabsetzung der Oxydationen im Organismus erblickten. So beurtheilten Stadthagen (2) den Einfluss der Leukämie, Ken Taniguti (3), Heffter (4), Jawein (5) den Einfluss von Alkalien, Rudenko (6), Save-lieff (7) den des Chloroforms, Harnack und Remertz (8) den des Chloralhydrats und des Amylenhydrats, Reale und Boëri (9) den Einfluss des Sauerstoffmangels auf die Oxydationsprocesse nach der relativen Menge des ausgeschiedenen neutralen Schwefels.

Sind wir nun zwar nach dem gegenwärtigen Stande unserer Kenntnisse über die Oxydationen nicht mehr berechtigt, aus der Ausscheidung sogenannter intermediärer Zersetzungsprodukte irgend einer dem Organismus einverleibten Substanz eine Störung der Oxydationsprocesse im Allgemeinen zu folgern, so geben dieselben doch über das Schicksal der betreffenden Substanz selbst Aufschluss.

1) Die Zahlen hinter den Autorennamen verweisen auf das Litteraturverzeichnis am Schluss.

Falls wir mithin bei magendarmkranken Säuglingen eine Vermehrung des unoxydirten auf Kosten des oxydirten Schwefels gegenüber der Norm feststellen könnten, so würden wir zu dem Schlusse berechtigt sein, dass hier eine Störung der Oxydation des Eiweisses zu seinen normalen Endprodukten vorläge.

Würde ein solcher Befund uns einen gewissen Anhalt zur Beurtheilung der oben erwähnten Frage von der Schädlichkeit einer sehr eiweissreichen Säuglingsernährung bieten, so dürfen wir andererseits gleichfalls einen Beitrag zu dieser Frage von der Untersuchung der Aetherschweifelsäureausscheidung erwarten.

Die von Biedert (10) aufgestellte und weit ausgeführte, aber nie wirklich bewiesene Theorie vom «schädlichen Nahrungsrest» lehrt, dass bei der künstlichen Ernährung in Folge der Schwerverdaulichkeit des Kuhcaseins ein übergrosser Rückstand unverdauter Eiweisskörper im Darne zurückbleibt und daselbst — abgesehen von den mechanischen Schädigungen, die er setzt — der Fäulniss anheimfällt. Eine Vermehrung der gepaarten Schwefelsäuren im Urin bei kranken Kindern würde eine Stütze dieser Theorie liefern.

Ein anderer Punkt betrifft die Function der Leber. Abgesehen von verschiedenen klinischen und allgemein pathologischen Analogien besitzen wir in den Untersuchungen von Thiemich (11), die inzwischen von zwei französischen Autoren (12, 13) bestätigt worden sind, einen anatomischen Nachweis dafür, dass die chronischen Magendarmerkrankungen bei Säuglingen häufig mit mehr oder minder hochgradigen Degenerationen der Leber einhergehen. Nun haben uns eine Reihe experimenteller und klinischer Thatsachen gelehrt, dass die Ausscheidung des neutralen Schwefels abhängig ist von dem Verhalten der Galle: Diejenigen Bedingungen, welche die Resorption von Galle im Körper vermindern (Anlegen einer Gallenfistel [Kunkel (13)]), führen zu einer Verminderung des neutralen Schwefels im Harn, während jene Bedingungen, die eine vermehrte Gallenresorption mit sich bringen (experimentelle Gallenstauung, Einleiten der Galle in die Peritonealhöhle, Icterus beim Menschen

[Lépine mit Guérin und Flavard (14), Reale und Velardi (15)], gleichzeitig eine Steigerung der Neutralschwefelausscheidung zur Folge haben. Somit wäre auch in dieser Beziehung ein abnormales Verhalten der chronisch magendarmkranken Säuglinge in das Bereich der Möglichkeit gerückt: Ein Darniederliegen der Leberfunction, soweit dasselbe auch die Gallenbereitung beträfe, würde zu einer Verminderung des neutralen Schwefels im Harn führen können.

Wir sehen bereits, dass im Stoffwechsel der uns beschäftigenden Organismen zwei pathologische Factoren als möglich vorauszusetzen sind, die die Ausscheidung des neutralen Schwefels im entgegengesetzten Sinne beeinflussen können. Die Beurtheilung dieser Verhältnisse wird aber noch durch einige andere Umstände complicirt. Wie wir vom Erwachsenen her wissen, ist die relative und absolute Grösse des Neutralschwefels individuellen Schwankungen unterworfen; ferner scheint dieselbe nicht unabhängig von der Art der Ernährung zu sein.

Hieraus ergibt sich für uns sofort die Forderung nach der Kenntniss der Verhältnisse der Schwefelausscheidung bei gesunden Säuglingen, und zwar bei den verschiedenen Ernährungsarten, die im Säuglingsalter zur Verwendung gelangen.

Um dies gleich vorauszunehmen, so ist diese Forderung für das Säuglingsalter äussert schwierig zu erfüllen. Säuglinge, die wir als völlig gesund oder «physiologisch» bezeichnen dürfen, stehen uns nur ausnahmsweise zur Verfügung, und zwar sind es dann meist Brustkinder, die eben nur die Verhältnisse der einen Ernährung zeigen und nicht ohne Weiteres die Kontrollzahlen für kranke Säuglinge bei den verschiedensten künstlichen Ernährungen liefern können. Bei diesen letzteren Kindern wiederum verbieten uns häufig therapeutische Rücksichten ein systematisches Abändern der Ernährung nach Art und Menge zum Versuchszweck.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sind in Tabelle I und III zusammengestellt, deren Inhalt sich aus den Ueberschriften ergibt. Es finden sich in jeder Tabelle drei gesunde Brustkinder, von denen das eine noch einmal unmittelbar nach dem Abstillen bei künstlicher Ernährung untersucht wurde.

Die an diesen Kindern gewonnenen Zahlen dürfen als physiologische betrachtet werden. Die übrigen Kinder sind meistens chronisch-krank, theilweise sogenannte atrophische, deren Charakteristik sich theils aus den Tabellen selbst (Alter, Körpergewicht), theils aus den weiter unten folgenden Krankengeschichten ergibt.

Der Urin wurde in der an unserer Klinik üblichen Weise verlustlos aufgefangen und zur Untersuchung je nach Umständen nur eine, meistens aber zwei und mehr Tagesmengen vereinigt verwendet. Die Bestimmung der Gesamtschwefelsäure wurde nach Salkowski, die der Aetherschwefelsäuren nach Baumann-Salkowski ausgeführt. Zur Bestimmung des Gesamtschwefels wurden 50 ccm. Harn in einem Porzellantiegel von 100 ccm. Inhalt eingedampft, wobei dem syrupösen Rückstande je nach der Concentration des Urins 5—10 g ¹⁾ eines Gemisches von 3 Theilen Natronsalpeter und 1 Theile Soda zugefügt wurde. Darauf wurde unter vorsichtigem Erhitzen die Substanz allmählich zum Schmelzen gebracht, die langsam erkaltete ²⁾ Schmelze durch dreimaliges Abrauchen mit je 100 g concentrirter Salzsäure von der Salpetersäure befreit, in Wasser aufgelöst und von der zurückbleibenden Kieselsäure abfiltrirt. Im angesäuerten Filtrate wurde dann die Chlorbaryumfällung vorgenommen, das Baryumsulfat erst nach 24 Stunden aufs Filter gebracht. Stets wurde mit Kontrollbestimmungen gearbeitet.

Aus der Tabelle I ergibt sich zunächst als die am meisten in die Augen fallende Thatsache, dass grosse Unterschiede in der Ausscheidung des Gesamtschwefels bei den verschiedenen Kindern bestehen. Die Fälle sind nach der Grösse der täglichen Gesamtschwefelausscheidung geordnet: Am oberen Ende findet sich die höchste Zahl 1,29276, am unteren Ende die niedrigste 0,25352. Ob diese Unterschiede allein durch die verschiedene Menge des mit der Nahrung aufgenommenen

1) Diese Mengen erwiesen sich stets als zur Oxydation sowie zur Vermeidung von Verpuffungen als ausreichend.

2) Berliner Porzellantiegel springen bei diesen Procedures bei genügender Vorsicht nie; allerdings dauert das Schmelzen manchmal bis eine Stunde.

Schwefels bedingt sind, lässt sich, da mir der Schwefelgehalt der jeweils aufgenommenen Nahrung nicht bekannt ist, nicht mit voller Sicherheit entscheiden; wohl aber darf man es mit grösster Wahrscheinlichkeit annehmen, da aus der Art und Menge der Nahrung, wie sie in der Tabelle verzeichnet ist, sich erschliessen lässt, dass die Grösse der Eiweisszufuhr — der fast alleinigen Quelle des Schwefels — sich in gleichem Sinne bewegt, wie die Gesamtschwefelausscheidung: am unteren Ende stehen die Brustkinder und die mit verdünnter Malzsuppe ernährten¹, weiter oben die Kinder, welche Kuhmilchverdünnungen in zunehmender Menge bzw. Concentration oder unverdünnte Malzsuppe, am oberen Ende die, welche noch eine Beikost von Griess zur Nahrung erhielten.

Wie vertheilt sich nun die Gesamtschwefelausscheidung auf die beiden Kategorien des sauren und des neutralen Schwefels? Wenn wir zunächst einmal absehen von den Unterschieden der Ernährung, des Alters, Körpergewichtes, Gesundheitszustandes, stellt sich ein eigenthümliches Verhalten heraus, welches mit den im Thierversuche gemachten Erfahrungen nicht im Einklang steht. Kunkel (13) beobachtete, dass, wenn er bei einem Hunde die tägliche Fleischration auf das Doppelte und Dreifache steigerte und dadurch die Gesamtschwefelausscheidung im gleichen Sinne beeinflusste, das Verhältniss zwischen neutralem und saurem Schwefel das gleiche blieb, d. h. dass beide in gleichem Maasse zunahmen. Demgegenüber ist nicht zu verkennen, dass in unserer Tabelle I eine annähernde Proportionalität zwischen Gesamtschwefel und saurem Schwefel besteht, während die Mengen des neutralen Schwefels zwar im oberen Theile der Tabelle theilweise auch etwas höher sind, als im unteren, dass sie aber im Ganzen in weit geringeren Grenzen schwanken, als die Mengen von Gesamtschwefel und saurem Schwefel. Dieses Verhalten muss nun natürlicher Weise die Procentzahlen des Neutralschwefels vom Gesamtschwefel in dem Sinne beeinflussen, dass am oberen Ende der Tabelle bei hoher Gesamtschwefelausscheidung sich die niedrigsten, am unteren Ende bei niedrigster Gesamtschwefelausscheidung sich die höchsten

Tabelle I.

Neutral-

Name	Nr. der Kranken- ge- schichte.	Datum des Versuchs	Alter	Körper- gewicht in Grammen	Ernährung
Alfred Ge .	III.	7.—8. VI. 99.	11 Mon.	5390	$\frac{1}{2}$ Milch + Hafereschleim 1 \times Gries
Emil P . . .	XIII.	28.—29. VI. 99.	8 Mon.	6040	dasselbe
Walther M . . . (1)	XI.	8.—10. V. 99.	4 $\frac{1}{2}$ Mon.	4430-4400	$\frac{1}{2}$ Milch + Hafereschleim
Kurt L . . . (1)	X.	26.—30. VII. 99.	2 $\frac{3}{4}$ Mon.	—	$\frac{2}{3}$ Milch (+ Milchzucker)
Walther M . . . (2)	XI.	30. V.—3. VI. 99.	5 $\frac{1}{2}$ Mon.	3960-3900	$\frac{2}{3}$ Milch
Otto Kle . . .	VIII.	7. - 9. V. 99.	5 $\frac{1}{2}$ Mon.	5750-5860	Malzsuppe
Oscar W . . .	XVII.	20.—30. VI. + 30. VI.—1. VII. 99.	2 $\frac{1}{4}$ Mon.	3890	$\frac{1}{2}$ Milch + Hafereschleim
Fritz Gu . . .	V.	7.—9. V. 99.	6 $\frac{1}{2}$ Mon.	3510	$\frac{1}{2}$ Milch + Hafereschleim
Hermann Sch . . . (1)	XV.	16.—19. V. 99.	3 $\frac{1}{2}$ Mon.	3600	$\frac{3}{5}$ Milch (5 Mahlzeiten)
Hermann Sch . . . (2)	XV.	11.—14. V.	3 $\frac{1}{4}$ Mon.	3740	$\frac{3}{5}$ Milch (10 Mahlzeiten)
Max Wo . . .	XVIII.	5.—7. VIII.	4 $\frac{1}{4}$ Mon.	5700-5770	Brust
Max Gl . . .	IV.	18.—20. VI.	3 Mon.	3540	Malzsuppe (verdünnt)
Max J . . . (1)	VI.	6.—8. VI. 99.	2 $\frac{1}{2}$ Mon.	3000	Malzsuppe (verdünnt)
Waldemar E . . .	II.	2. - 5. VIII. 99.	4 $\frac{1}{2}$ Mon.	3020-3100	Malzsuppe (verdünnt)
Walther M . . . (3)	XI.	16.—21. V. 99.	5 Mon.	—	Brust
Max J . . . (2)	VI.	3.—6. V. 99.	1 $\frac{1}{4}$ Mon.	3050-2970	Malzsuppe (verdünnt)
Hermann Sch . . .	XV.	12.—15. VI. 99.	4 $\frac{1}{4}$ Mon.	3210-3170	Brust
Bruno R . . .	XIV.	8.—11. VIII. 99.	5 $\frac{1}{2}$ Mon.	4300-4400	Malzsuppe
Kurt L . . . (2)	X.	19.—20. VII. 99.	2 $\frac{1}{2}$ Mon.	4850	Brust
Paul Kl . . . z	VII.	17.—19. VIII. 99.	2 Mon.	3920-3970	Brust

Schwefel.

Durchschnittliche tägliche		Gesamt-S in Grammen BaSO ₄ pro die	Gesamt- H ₂ SO ₄ in Grammen pro die	Neutral-S in Grammen BaSO ₄ pro die	Neutral-S in % des Gesamt-S
Nahrungs- menge	Urinmenge				
800 — 1 X (Gries)	420	1,29276	1,14786	0,1449	11,2
800 — 1 X (Gries)	525	1,2012	1,844725	0,356475	14,6
750	455	1,03194	0,7735	0,25844	25,0
600 — 30 g)	640	0,73984	0,50304	0,2368	31,9
675	350	0,7385	0,5593	0,1792	24,17
950	265	0,72186	0,574255	0,147605	20,44
500	335	0,67402	0,502165	0,171855	18,5
750	460	0,67160	0,57086	0,10074	13,4
640	340	0,50184	0,39916	0,10268	20,4
640	395	0,4977	0,36103	0,13667	28,4
905	470	0,44838	0,21714	0,23124	51,5
500	215	0,43848	0,35826	0,08022	18,22
420	385	0,41965	0,21406	0,20559	48,59
570	240	0,37008	0,20544	0,16464	44,5
—	300	0,3402	0,2013	0,1389	40,8
420	240	0,30624	0,15336	0,15288	50,0
460	160	0,29376	0,21584	0,07792	25,16
600	245	0,28714	0,21119	0,07595	26,4
810	650	0,2548	0,1365	0,1183	46,4
505	305	0,25352	0,1159	0,13762	56,0

Procentzahlen finden. Ich sprach oben von einer nur annähernden Proportionalität; denn ein Blick lehrt, dass einige der Zahlen aus dem Rahmen herausfallen. Nichtsdestoweniger erscheint mir doch im Grossen und Ganzen das oben angegebene Verhältniss zwischen Gesamtschwefel und saurem Schwefel genügend deutlich. Wie sehr die Grösse der Gesamtschwefelausscheidung, d. h. der Eiweisszersetzung, die Procentzahlen des Neutralschwefels zu beeinflussen vermag, lässt sich da am deutlichsten — weil mit Ausschaltung der individuellen Unterschiede — zeigen, wo in unserer Tabelle dieselben Kinder mit verschiedener Art und Menge der Nahrung, mithin verschieden grosser Gesamtschwefelausscheidung, vertreten sind. Es ist dies der Fall bei den Kindern L und M (bei dem Kinde Sch schwanken die absoluten Zahlen des neutralen Schwefels selbst recht erheblich).

Tabelle Ia.

Nahrung.	Gesamt-S.	Saurer S.	Neutraler S.	Neutraler S. Gesamt-S.
Kurt L				
$\frac{2}{3}$ Milch (600 g) .	0,73984	0,50304	0,2368	31,9 %
Brust (810 g)	0,2548	0,1365	0,1183	46,4 %
Walther M				
$\frac{1}{2}$ Milch + Hafer- schleim (750 g) .	1,03194	0,7735	0,25844	25,0 %
$\frac{2}{3}$ Milch (675 g) . .	0,7385	0,5593	0,1792	24,17 %
Brust	0,3402	0,2013	0,1389	40,8 %

Dieser Punkt ist nun deswegen von principieller Bedeutung, weil in der Lehre vom Erwachsenen vielfach die Procentzahlen des Neutralschwefels vom Gesamtschwefel berücksichtigt worden und verschiedentlich [Munk (16), Lépine mit Guérin und Flavard (14), Mester (17), Kast und Mester (18), Heffter (4)] die absoluten Ausscheidungsgrössen

gar nicht angegeben sind, als ob jenes Procentverhältniss unabhängig von diesen eine constante Function des einzelnen Organismus wäre. Dass es dies nun beim Säuglinge ganz und gar nicht ist, dass vielmehr hier die Grösse der Eiweisszersetzung in erster Reihe die Procentzahl beherrscht, geht aus dem Gesagten hervor.

Da es mir nun aber von vornherein unwahrscheinlich war, dass ein so principieller Gegensatz zwischen den kindlichen und den erwachsenen Organismen bestehen sollte, stellte ich die absoluten Zahlen der Schwefelausscheidung von gesunden Erwachsenen, soweit sie sich in der Litteratur verstreut angegeben fanden, oder wenigstens aus den sonstigen Angaben der Autoren nachträglich durch Rechnung construirbar waren, in einer der meinigen entsprechenden Tabelle, nach der Grösse der Gesamtschwefelausscheidung geordnet zusammen. (Tabelle II.)

Tabelle II.

Name des Autors.	Bezeichnung des Versuchs.	In 24 Stunden wurden ausgeschieden:			Procente des neutralen vom Gesamt- S.
		Gesamt- Schwefel (als S).	Saurer Schwefel (als S).	Neutraler Schwefel (als S).	
Heffter (4)	Person W (Fleischdiät)	1,79	1,50	0,29	16,2
Heffter.....	Person H (Fleischdiät)	1,78	1,33	0,45	25,3
Beck u. Benedikt (19)	Tabelle V, 1. Ruheperiode	1,3547	1,1042	0,2505	18,3
Heffter.....	Person W (Milchdiät)	1,1	0,91	0,19	17,2
Stadthagen (20)...	2. Versuch	1,0905	0,939	0,1515	13,89
Heffter.....	Person H (gemischte Kost)	1,04	0,79	0,25	24,3
Salkowski (21)...	Individuum V	0,9647	0,807	0,1577	16,3
J. Munk (22).....	Ruheperiode I	0,94	0,7	0,24	25,5
Stadthagen.....	Selbstversuch	0,8844	0,7593	0,1251	14,1
Heffter.....	Person H (Milchdiät)	0,87	0,67	0,20	23,6
Heffter.....	Person W (gemischte Kost)	0,72	0,53	0,19	26,3
Stadthagen.....	3. Versuch	0,6567	0,569	0,0877	13,3
Heffter.....	Person W (Brot diät)	0,64	0,43	0,21	33,2
Heffter.. . . .	Person H (Brot diät)	0,62	0,40	0,22	33,3

Vereinigt nun diese Tabelle ein ausserordentlich heterogenes Material — selbst Ungleichmässigkeiten in der Handhabung der Methodik sind nicht sicher auszuschliessen —, so erscheint es mir um so bemerkenswerther, dass auch hier unleugbar die Schwankungen des neutralen Schwefels, insbesondere wenn man von der höchsten und der niedrigsten Zahl (0,0877 und 0,45) absieht, minimale sind im Vergleich zu denen des sauren und des Gesamtschwefels; dementsprechend steigen auch hier im Allgemeinen die Procentzahlen nach dem unteren Ende der Tabelle zu an. Erheblich deutlicher tritt aber auch hier die Abhängigkeit der Procentzahlen von der Grösse der Eiweisszersetzung hervor, wenn wir in analoger Weise, wie oben, die mit verschieden grosser Gesamtschwefelausscheidung vertretenen Einzelindividuen gesondert betrachten; es sind dies die beiden Versuchspersonen Heffter's (4).

Tabelle IIa.

Diät	Person W.				Diät	Person H.			
	Gesamt-S	Saurer S.	Neutraler S	Neutraler S: Gesamt-S		Gesamt-S	Saurer S	Neutraler S	Neutraler S: Gesamt-S
Fleischdiät . .	1,79	1,5	0,29	16,2 %	Fleischdiät . .	1,78	1,30	0,45	25,3 %
Milchdiät . . .	1,1	0,91	0,19	17,2 %	Gem. Kost . .	1,04	0,79	0,25	24,3 %
Gem. Kost . .	0,72	0,53	0,19	26,3 %	Milchdiät . . .	0,87	0,67	0,20	23,6 %
Brottdiät	0,64	0,43	0,21	33,2 %	Brottdiät	0,62	0,40	0,22	33,3 %

Heffter, der in seiner Arbeit die absoluten Zahlen seiner Versuche nicht bringt und sie vermuthlich gar nicht kannte, führt die Unterschiede der Procentzahlen auf die verschiedene Bindung des S im Eiweiss der verschiedenen Nahrungsmittel zurück. Allein angesichts der Thatsache, dass die absolute Ausscheidung des neutralen Schwefels bei den verschiedenen Ernährungsarten fast gleich ist, darf man wohl jene Annahme ohne Weiteres zurückweisen: die Entstehung der verschiedenen hohen Procentzahlen erklärt sich hier in unserem Sinne ganz von selbst.

Immerhin weisen aber doch die Zahlen der Tabelle II auf **genug andere**, meiner Beurtheilung völlig entzogene, Einflüsse hin, **als dass** ich einen sicheren Schluss daraus ableiten könnte, einen **wie grossen** Antheil beim Erwachsenen die Grösse der Eiweisszersetzung an den Verschiedenheiten der Procentzahlen des neutralen Schwefels hat, und in wie weit andererseits die **absoluten** Zahlen der letzteren selbst individuellen und sonstigen Schwankungen unterliegen.

Von um so grösserer Wichtigkeit ist es mir deshalb, dass **Benedikt (23)** in einer umfassenden Arbeit, die mir leider erst nach Abschluss meiner Untersuchungen bekannt geworden ist, auf der **breiten** Grundlage einer grösseren Anzahl von Stoffwechselversuchen, auch mit Heranziehung der obigen Zahlen von **Heffter**, für den Erwachsenen die Thatsache feststellt, dass die Grösse der absoluten Neutralschwefelausscheidung innerhalb sehr geringer Grenzen schwankt, hingegen das Verhältniss Neutralschwefel: Gesamtschwefel äusserst labil ist und zwar **abhängig** von der Grösse der Eiweisszersetzung, d. h. der Gesamtschwefelausscheidung.

Ist nun durch diese Feststellung die Bedeutung jenes so viel discutirten Quotienten als solchen für den Erwachsenen ebenso annullirt, wie ich dies auf Grund meiner Tabellen I und Ia für das Säuglingsalter thun konnte, so wendet sich nunmehr unser Interesse ausschliesslich der absoluten Menge des täglich ausgeschiedenen neutralen Schwefels zu. Bezüglich dieser hat **Benedikt** es sehr wahrscheinlich gemacht, dass sie zu einem Theile ein constantes, selbständiges, im Stoffwechsel nicht weiter oxydirbares Endprodukt darstellt, dessen absolute Grösse für die einzelnen Individuen annähernd gleich zu sein scheint, während ein anderer, mehr oder weniger grosser Antheil ein «intermediäres» Stoffwechselprodukt, d. h. Muttersubstanz der Schwefelsäure ist. An diesem Antheile können sich nur jene relativ geringen Schwankungen und individuellen Unterschiede abspielen, welche in der That beim Erwachsenen zur Beobachtung kommen und welche auch unsere Säuglinge in Tabelle I zeigen.

Wenn wir nun einen Versuch machen, diese Unterschiede

zu beurtheilen, so dürfen wir wohl die qualitativen Verschiedenheiten der Eiweisskörper der Nahrung bezüglich der Bindung des Schwefelatoms ausser Acht lassen. Ergibt sich die Bedeutungslosigkeit der Heffter'schen Zahlen in dieser Beziehung aus der Tabelle IIa, so bleiben nur noch die Beobachtungen von Kunkel (13) und von Malerba (24) an Hunden übrig. Ersterer fand bei Eiernahrung eine procentualisch etwas geringere Neutralschwefelausscheidung (33 %), als bei gleich eiweissreicher Fleischnahrung (36 %), letzterer bei Eiernahrung eine etwas geringere Neutralschwefelausscheidung (26 %), als bei gleich schwefelreicher¹⁾ Käsenahrung (30%). Wenn aber hiernach die Unterschiede zwischen den Eiweisskörpern der Milch, des Fleisches, des Hühnereis so geringfügig sind, so haben wir wohl vorläufig keinen Anlass, erheblichere Differenzen zwischen den Caseinen der einzelnen Milcharten zu erwarten.

Wenn wir nun schliesslich zur Beurtheilung unserer Zahlen den Gesundheitszustand der untersuchten Säuglinge heranziehen wollen, so müssen wir dabei von den gesunden Kindern ausgehen, die, wie oben erwähnt, uns die 4 physiologischen Zahlenreihen der Tabelle liefern. Es sind dies die Kinder L... (1 und 2, bei Brust- und Kuhmilchernahrung), Wo... und Kl...tz. Da wir oben gesehen haben, dass die absoluten Zahlen des neutralen Schwefels zwar in geringem Grade — verglichen mit den Zahlen des sauren Schwefels —, aber doch erkennbar mit der Grösse des Gesamtschwefels schwanken, d. h. im oberen Theile der Tabelle im Allgemeinen etwas grösser sind als im unteren Theile, so dürfen wir die normalen Kinder immer nur mit ihren Nachbarn in der Tabelle, d. h. denen mit annähernd gleicher Gesamtschwefelausscheidung, vergleichen. Hierbei ergibt sich nun, dass gerade die Normalzahlen ihre Nachbarn nicht unwesentlich überragen; dies gilt sowohl für L... 2 und Kl...tz, als ganz besonders für Wo... und L... 1. Oder anders ausgedrückt:

¹⁾ Bei Malerba sind auch in beiden Versuchsperioden die Grössen der Gesamtschwefelausscheidung gleich; bei Kunkel sind dieselben nicht angegeben.

Unter den untersuchten Kindern mit annähernd gleicher Gesamtschwefelausscheidung wird von den gesunden mehr neutraler Schwefel ausgeschieden als von den kranken.

Da ich bisher nur über vier, d. h. verhältnissmässig wenige physiologische Daten verfüge, so muss ich es dahingestellt sein lassen, inwieweit jener Satz eine Verallgemeinerung zulassen wird. Eines geht aber für uns schon jetzt hervor: Der Befund einer verhältnissmässig grossen Neutralschwefelausscheidung bei Säuglingen kann nichts Pathologisches sein, wenn unter den von uns untersuchten Kindern gerade die gesunden ihn darbieten.

Wenn wir nun auf die Eingangs angestellten Erwägungen zurückgreifen, so müssen wir sagen, dass wir bei unsern Untersuchungen auf eine pathologische Steigerung der Neutralschwefelausscheidung nicht gestossen sind, dass sich also vermittelst derselben eine Störung der Oxydation des Eiweisses bei den magendarmkranken Säuglingen jedenfalls nicht herausstellt. Vielmehr sind wir genöthigt, eine andere Frage zu stellen: Warum wird bei gleicher Gesamtschwefelausscheidung von den untersuchten kranken Säuglingen weniger neutraler Schwefel ausgeschieden, als von den untersuchten «physiologischen»?

Mir scheint, dass dieses merkwürdige Verhalten, sofern durch weitere systematische Untersuchungen das Ergebniss der bisherigen ja nur casuistischen sich bestätigen lässt, am ehesten in der oben bereits angedeuteten Weise erklären liesse, nämlich vermittelst der Annahme einer verminderten Production von Galle, speciell des schwefelhaltigen Bestandtheiles derselben, der Taurocholsäure, von der wir durch die Untersuchungen von Jakubowitsch (25) und von Baginsky und Sommerfeld (26) wissen, dass sie unter physiologischen Verhältnissen sich in nicht unerheblicher Menge in der Säuglingsgalle vorfindet, nach Jakubowitsch sogar in relativ grösserer Menge als beim Erwachsenen.

Die Besprechung der Tabelle III erfordert nur wenige Worte. Auch hier ist natürlich das Procentverhältniss zwischen Aetherschwefelsäuren und Gesamtschwefelsäure ohne alle Be-

Tabelle III.

Aether-

Name	Nr. der Krankengeschichte	Datum des Versuchs	Alter	Körpergewicht in Grammen	Ernährung
Curt L...	X.	19.-20. VII. 99. 26.-30. VII. 99.	2 $\frac{1}{4}$ Mon. 2 $\frac{1}{4}$ Mon.	4850	Brust $\frac{2}{3}$ Milch
Max Wo...	XVIII.	5.-7. VIII. 99.	4 $\frac{1}{4}$ Mon.	5700-5770	Brust
Paul Kl...z	VII.	17.-19. VIII. 99.	2 Mon.	3920-3970	Brust
Waldemar E...	II.	2.-5. VIII. 99.	4 $\frac{1}{4}$ Mon.	3020-3100	Malzsuppe (verdünnt)
Bruno R...	XIV.	8.-11. VIII. 99.	5 $\frac{1}{4}$ Mon.	4300-4400	Malzsuppe
Walther Mi...	XII.	22.-24. II. 99.	5 Mon.	5400-5420	Malzsuppe
Max J...	VI.	24.-26. IV. 99. 3.-6. V. 99.	4 Wochen 5 Wochen	2950-3000 3050-2970	Malzsuppe (verdünnt) Malzsuppe
Fritz G...	V.	7.-9. V. 99.	6 $\frac{1}{4}$ Mon.	3510	$\frac{1}{3}$ Milch + Haferschleim
Walther M...	XI.	8.-10. V. 99.	4 $\frac{1}{4}$ Mon.	4430-4400	$\frac{1}{3}$ Milch + Haferschleim
Oscar W...	XVII.	29. VI.-1. VII. 99.	9 Wochen	3890	$\frac{1}{3}$ Milch + Haferschleim
Emil P...	XIII.	28.-29. VI. 99.	8 Mon.	6040	$\frac{1}{3}$ Milch + Haferschleim 1 X Griess
Arthur A...	I.	3.-5. I. 98. 7.-9. I. 98.	3 Mon. 3 Mon.	2920 2980	$\frac{1}{3}$ Milch $\frac{1}{3}$ Milch
Hermann St...	XVI.	29.-31. I. 99. 3.-5. II. 99.	3 $\frac{3}{4}$ Mon. 4 Mon.	2930 2980-3080	$\frac{1}{3}$ Milch $\frac{1}{3}$ Milch + Haferschleim
Hermann Sch...	XV.	25. 26. -27. 28. IV. 99. 16.-19. V. 99. 12.-15. VI. 99.	3 Mon. 3 $\frac{1}{4}$ Mon. 4 $\frac{1}{4}$ Mon.	4000 3600 3210-3170	$\frac{1}{3}$ Milch $\frac{2}{3}$ Milch Brust
Alfred Ge...	III.	9.-14. II. 99. 23.-26. III. 99.	7 Mon. 8 Mon.	4760-4770 5130-5210	Brust Brust + Malzsuppe Brust
		24.-26. IV. 99.	9 Mon.	5290-5350	$\frac{1}{3}$ Milch Griess
Paul K...	IX.	19.-21. VIII. 99. 22.-23. VIII. 99. 24.-25. VIII. 99.	5 Mon. 5 Mon. 5 Mon.	4000-3610 3840-3870 3850-3930	Thee $\frac{1}{3}$ Ziegenmilch + Mondamin $\frac{1}{3}$ Ziegenmilch + Mondamin

Schwefelsäuren.

Durchschnittliche tägliche		Gesamt- H ₂ SO ₄ in Grammen BaSO ₄ pro die	Aether-H ₂ SO ₄ in Grammen BaSO ₄ pro die	Aether- H ₂ SO ₄ in % des Gesamt- H ₂ SO ₄	Stuhl und sonstige Bemerkungen
Nahrungs- menge	Urin- menge				
810	650	0,1365	0,0091	6,6	Normaler Brustmilchstuhl.
600	640	0,50304	0,01024	2,0	Normaler Kuhmilchstuhl.
505	470	0,21714	0,013160	6,0	} Normaler Brustmilchstuhl.
505	305	0,1159	0,016165	13,9	
570	240	0,20544	0,03504	17,0	2—3 × täglich schleimig, dünnbreig, geruchlos.
600	245	0,21119	0,04312	20,4	3—5 × Stuhl ohne Besonderheiten.
1000	310	0,47962	0,06194	12,91	4 × täglich ohne Besonderheiten.
490	295	0,13393	0,064015	47,7	} Stuhl 2—3 × täglich ohne Fäulnisgeruch.
420	240	0,15336	0,04344	28,3	
750	460	0,57086	0,07682	13,8	Mehrmals täglich Stuhl ohne Besonderheiten.
750	455	0,7735	0,09373	12,1	1 × täglich weisser, fester Stuhl.
500	335	0,502165	0,09246	18,5	Kein Stuhl entleert.
800 (+ 1 × Gries)	525	0,844725	0,1219	14,6	2—3 × schöner gelber Stuhl.
730	440	0,1694	0,04136	24,4	} 3—4 × täglich Stuhl von starkem Fäulnisgeruch.
750	520	0,2496	0,03744	15,0	
750	535	0,70401	0,03317	4,71	} 1—2 × täglich Stuhl von deutlichem Fäulnis- geruch.
750	505	0,63024	0,04646	10,29	
1025	570	0,43203	0,0171	3,9	} 4—5 × Stuhl, dünn, ge- ruchlos.
640	340	0,39916	0,04658	11,7	
460	160	0,21584	0,03696	16,9	Starker Fäulnisgeruch.
660	260	0,130001	0,02717	20,9	1—2 × Stuhl ohne Besonderheiten.
510	215	0,394095	0,035045	8,89	6 × täglich dünner, schleimiger Stuhl.
+ 400					
160					
575 (+ 1 × Gries)	310	0,86087	0,093	10,8	4—5 × täglich Stuhl ohne Besonderheiten.
	170	0,51272	0,05066	9,8	} Vergleiche die Kranken- geschichte.
630	410	0,28208	0,13694	48,5	
750	600	0,2004	0,0402	20,0	

deutung, da die Schwankungen der letzteren sehr erhebliche sind. Was die absoluten Mengen der gepaarten Schwefelsäuren betrifft, so sind sie im Allgemeinen sehr gering, am geringsten bei den drei gesunden Kindern (siehe die vier obersten Reihen der Tabelle), am grössten bei den älteren Säuglingen, die zum Theil schon eine Zukost von Griess erhalten; doch liegen alle Unterschiede innerhalb sehr geringer Grenzen. Ein Zusammenhang der Zahlen mit der Beschaffenheit der Stuhlentleerungen, wie mit der Art der Ernährung, ist nicht erweisbar. Nur in einem einzigen Falle, der sich auch klinisch erheblich abweichend von den anderen verhielt — es handelt sich um das Kind Paul K . . . , Krankengeschichte VII —, kam eine bedeutende Aetherschwefelsäureausscheidung zur Beobachtung, die ohne Weiteres als pathologisch bezeichnet werden darf. Es gelang hier, wie aus der Tabelle hervorgeht, durch Eingabe von Gorit (Calciumsuperoxyd), welches sich in dieser Beziehung nach den Versuchen von Nencki und Zaleski (28) bei Hunden als wirksam erwiesen hatte, die Aetherschwefelsäuremenge herabzusetzen. In diesem einen Falle einer acuten Erkrankung dürfen wir also annehmen, dass es sich um eine pathologische Steigerung der Fäulnisvorgänge im Darne gehandelt hat. In allen übrigen Fällen von meist chronischem Verlaufe hat sich vermittelst der Aetherschwefelsäureausscheidung eine erheblichere Darmfäulnis nicht nachweisen lassen, so dass diese Untersuchungen keine Stütze für die Eingangs erwähnten Biedert'schen (10) Anschauungen liefern.

Krankengeschichten.

I. Arthur A Ausgetragenes, hereditär nicht belastetes Kind. Ueber die drei ersten Lebensmonate ist nur so viel zu eruiren, dass das Kind $\frac{1}{4}$ Milch + Wasser zur Nahrung erhalten und, ohne Magendarmerscheinungen zu zeigen, an Körpergewicht immer mehr abgenommen haben soll. Am 29. XII. 1897 Aufnahme auf die Klinik im Alter von 3 Monaten. Körpergewicht 2870 g. Starke Abmagerung, schlaaffe Bauchdecken. Erhält $\frac{1}{4}$ Milch, dabei täglich 3—4 mal gebundener Stuhl von starkem Fäulnisgeruch. Versuchstage 3.—5. und 7.—9. I. 1898.

II. Waldemar E Hereditär luetisches, aber angeblich ausgetragenes Kind, kam am 9. VI. 1899 im Alter von 11 Wochen in die Poliklinik, war bis dahin mit $\frac{1}{4}$ Milch — Anfangs mit Wasser, später

mit Haferschleim verdünnt — ernährt worden. Hatte fast dauernd Magendarmerscheinungen gezeigt und an Körpergewicht zusehends abgenommen. Zunächst 6 wöchentliche Inunctionskur. Ernährung: $\frac{1}{2}$ Milch + Haferschleim in 4stündlichen Pausen. Hierbei Körpergewichtsrückgang in 14 Tagen von 3570 g bis 3050 g und beginnende Furunkulose. Darauf poliklinische Ernährung mit Malzsuppe: Körpergewichtszunahme in 4 Wochen bis 3300 g. Darauf acute Erkrankung (Durchfall, Bronchitis). Abnahme auf 3050 g. Weiteres Umsichgreifen der Furunkulose. Am 31. VII. Aufnahme auf die Klinik. Ernährung: Weiter Malzsuppe. Dabei 2—3 mal täglich schleimiger, dünnbreiiger, nicht stinkender Stuhl. Während der Versuchstage 2.—5. VIII. Körpergewichtszunahme von 3020 g auf 3100 g. — Es handelt sich hier um ein blasses, mageres Kind mit dem ausgesprochenen Bilde der Atrophie, ohne positiven pathologischen Organbefund.

III. Alfred Ge... wurde am 8. XI. 98 auf die Klinik aufgenommen, 4 Monate alt, mit einem Körpergewichte von 5030 g. Ueber die Vorgeschichte nichts Besonderes zu eruiren. In den ersten drei Monaten trotz verschiedenster diätetischer und therapeutischer Massnahmen häufige Magendarmerscheinungen und Rückgang des Körpergewichtes auf ca. 4800 g. Darauf ausschliessliche Brusternährung bis zum 2. III. 99. (Körpergewicht 5010 g.) Von da ab wurde die Brusternährung allmählich durch Malzsuppe ersetzt, später Griess, Bouillon, Gemüse hinzugefügt, wobei bis Mitte Mai Zunahme auf 5460 g. Nun wiederum acute Erkrankung und Abnahme auf 4900 g (das gleiche Gewicht, wie etwa $\frac{1}{2}$ Jahr vorher). Von dann ab schliesslich bei $\frac{1}{2}$ Milch + Haferschleim und einer Mahlzeit Griess Körpergewichtszunahme bis auf 5660 g am 14. VI. 99. — Das Kind charakterisirt sich durch den monatelangen Gewichtsstillstand als ein im hohen Grade atrophisches.

IV. Max Gl... wird am 13. VI. 99 im Alter von 3 Monaten auf die Klinik aufgenommen, nachdem er die ersten vier Lebenswochen die Mutterbrust, dann Milch + Hafermehl als Nahrung erhalten und dabei besonders in letzter Zeit Magendarmerscheinungen gezeigt hatte. Gewicht bei der Aufnahme 3390 g. Ernährung: Malzsuppe. Dabei 4—5 mal täglich dünner Stuhl, bisweilen Erbrechen, aber gute Körpergewichtszunahme. Während der Versuchstage häufigeres Erbrechen und 6—7 mal wässriger Stuhl, so dass unmittelbar darauf Theediät eingeleitet wurde. Danach nach 3tägiger Abnahme erneute gute Körpergewichtszunahme bei Malzsuppenernährung. — Auch hier handelt es sich um ein blasses ziemlich mageres Kind mit schlaffen Bauchdecken.

V. Fritz Gu... wurde am 20. I. 99, 3 Monate alt, 3370 g schwer, in poliklinische Behandlung gebracht, weil er bei der bisherigen Ernährung (Milchverdünnungen mit Haferschleim) Magendarmerscheinungen zeigte und nicht zunahm. Zunächst poliklinische Ernährung mit Malzsuppe bis zum 2. III. Körpergewichtszunahme von 3280 g auf 3980 g. Darauf Aufnahme auf die Klinik und weitere Zunahme bis zum 10. III.

auf 4250 g. Darauf mehrere acute fieberhafte Erkrankungen, in deren Gefolge dauerndes Siechthum (ausgebreitete Furunkulose), so dass während der Versuchstage, 7.—9. V., das Körpergewicht nur 3510 g beträgt. (Mit $6\frac{1}{2}$ Monaten dasselbe Körpergewicht, wie etwa mit $3\frac{1}{2}$ Monaten.) — Auch hier handelt es sich um ein elendes, abgemagertes, atrophisches Kind.

VI. Max J. . . . wurde als ausgetragenes Kind durch Sectio caesarea geboren, von Anfang an künstlich genährt mit Milchverdünnungen, Hafergrütze, dann mit Malzsuppe. Mit 3 Wochen Aufnahme auf die Klinik. Körpergewicht 2770 g. Ernährung: Malzsuppe. Hierbei nach anfänglicher Zunahme langer Stillstand des Körpergewichtes auf 3000 g. Nie erhebliche Magendarmerscheinungen, nur zuweilen etwas Erbrechen. 2—3 mal täglich Stuhl ohne Fäulnisgeruch. — Kleines Kind in mässigem Ernährungszustande ohne pathologischen Organbefund.

VII. Paul K. . . . kam am 25. V. 99 im Alter von 10 Wochen, 3870 g schwer, in poliklinische Behandlung. Hatte erst Mutterbrust, dann Milchverdünnungen erhalten, litt an Obstipation und multiplen Hautabscessen. Schnelle Besserung und anfängliche Zunahme bei $\frac{1}{2}$ Milch + Zwieback, acute Erkrankung mit Durchfall und Abnahme bis auf 3690 g am 9. VI., wieder Reconvalescent und Zunahme bis 4350 g in den nächsten 6 Wochen. Hierauf wiederum acute Erkrankung ausserhalb unserer Behandlung. Nach vorübergehender Besserung und angeblicher Gewichtszunahme erschien nun das Kind am 18. VIII. mit einer neuen, schweren, acuten — seit drei Tagen bestehenden — Magendarm-erkrankung (täglich 11—12 spritzende, grüne Stühle). Eine Darmauspülung entleert ausserordentlich grosse Mengen stinkenden Kothes. Trotz 24stündiger Wasserdiät noch 8 wässrige Stühle und Erbrechen. Deswegen am 19. VIII. Aufnahme auf die Klinik mit einem Körpergewichte von 4000 g. Während der nächsten 48 Stunden Theediät, dabei im Ganzen 2 mal Stuhl, davon der zweite ein Theestuhl. Sodann $\frac{1}{2}$ Ziegenmilch + Mondamin. Hierbei allmähliche Gewichtszunahme (21. VIII. 3610 g — 25. VIII. 3930 g) und Anfangs 3—4 mal täglich stinkender Stuhl. Vom 24. VIII. ab erhielt das Kind einen Zusatz von 0,18 g Gorit zu jeder Mahlzeit. Von da ab homogener, gelber Stuhl. — Es handelt sich um ein sonst kräftiges, während der acuten Erkrankung stark abgemagertes Kind.

VIII. Otto Kle. . . wurde am 25. IV. mit $5\frac{1}{2}$ Monaten wegen eines perianalen Abscesses auf die Klinik aufgenommen. Bei der Aufnahme 39,3 Temperatur und 5690 g Körpergewicht. Incision des Abscesses, Ernährung mit Malzsuppe. 3—4 mal täglich schöner Stuhl. Incisionswunde heilt. Doch während der nächsten Wochen Temperatur stets nahe an 38,0, ohne dass sich hierfür ein Grund finden liesse. Körpergewichtstillstand. — Es handelt sich um ein kräftiges Kind mit straffen Bauchdecken und gesunder Gesichtsfarbe. Während der Versuchstage ca. 38,0 Temperatur.

IX. Paul Kl...tz. Ammenkind, geb. den 22. VI. 99, während der ersten Lebenstage in der hiesigen Frauenklinik. Dann mit der Mutter Aufnahme in die Kinderklinik, zeigte während seines bisherigen Lebens, während dessen es 5 mal pro 24 Stunden an die Brust angelegt wurde, ein physiologisches Verhalten und eine regelmässige Körpergewichtszunahme.

X. Curt L... Ammenkind, geb. den 6. V. 99, zeigte in den ersten Lebenswochen eine leichte Magendarmstörung, während der kurze Zeit das Körpergewicht stillstand. Von da ab in jeder Beziehung normales Verhalten.

XI. Walther M... wurde mit $\frac{1}{4}$ Jahre und einem Körpergewicht von 3840 g am 15. III. 99 in die Poliklinik eingebracht. Bronchitis, Soor, schlechter Ernährungszustand. Während poliklinischer Beobachtung Reconvalensz. Am 3. V. Aufnahme auf die Klinik wegen acuter Erkrankung mit einem Körpergewicht von 4810 g. Ernährung: Erst 24 Stunden Wasserdiet (Abnahme auf 4450), dann $\frac{1}{2}$ Milch und Haferschleim bis zum 12. V. Abnahme bis auf 4390 und täglich spärlicher, weisser, fester Stuhl (am 6. V. kein Stuhl). Darauf Brusternährung: Körpergewichtstillstand. In der Folge erst $\frac{1}{2}$ Milch, dann $\frac{1}{3}$ Milch, bei welcher Ernährung die Zahl der Stühle 4—5 betrug und das Körpergewicht auf 3900 g herunterging. Darnach bei Ernährung mit Malzsuppe Körpergewichtszunahme. — Es handelt sich um ein Kind, dessen Körpergewicht während des Aufenthaltes auf der Klinik infolge einer acuten Erkrankung stark abnahm. Schlechter Ernährungszustand, blasse Farbe, schlaffe Bauchdecken.

XII. Walther Mi... wurde mit $4\frac{1}{2}$ Monaten auf die Klinik aufgenommen. Hatte Anfangs die Mutterbrust, dann Milch mit Haferschleim zur Nahrung erhalten. Hierbei seit 10 Wochen andauernde Verdauungsstörungen. Körpergewicht bei der Aufnahme 5270 g. Nach 24stündiger Theediet: Ernährung mit Malzsuppe. Keine Magendarmerscheinungen. (4 mal täglich Stuhl) — Kind in leidlichem Ernährungszustande, in Zunahme begriffen.

XIII. Emil P... Zwillingsskind. Kam mit 3 Monaten in die Poliklinik wegen zeitweiligen Erbrechens und Obstipation bei 2stündlicher Ernährung mit Milch und Haferschleim. Damals am 9. I. 99 Körpergewicht 4620 g. In der Folge Otitis media chronica und andauernd Katarhe der Luftwege; dennoch bei Ernährung mit $\frac{1}{2}$ Milch, $\frac{1}{2}$ Zwieback bis zum 15. V. Körpergewichtszunahme bis auf 6350 g. Darauf mehrfache acute Magendarmkrankungen, so dass das Kind am 22. VI. mit einem Gewicht von nur 5890 auf die Klinik aufgenommen wurde. 24stündige Theediet; dann $\frac{1}{2}$ Milch und Haferschleim und 1 mal Griess täglich. 2—3 mal schöner gelber Stuhl, ohne Fäulnisgeruch. Zunahme in 8 Tagen von 5890 auf 6150. — Wohlbefinden und leidlicher Ernährungszustand.

XII. Bruno R... Tuberkulös belastet. Am 5. VIII. Aufnahme

auf die Klinik. Alter: 5½ Mon. Körpergewicht 4440 g. Stets mit Milch und Mehl ernährt. Hatte mit 7 Wochen Furunkulose, mit 2 Monaten Masern, seitdem fortdauernde Magendarmerscheinungen und Körpergewichtsabnahme, zuletzt auch Husten. Nach anfänglicher Theediät: Malzsuppe. Dabei beginnende Zunahme des Körpergewichtes. Täglich 3—5 mal Stuhl. — Mässig genährtes, sehr blasses Kind ohne pathologischen Organbefund.

XV. Hermann Sch... wurde am 24. IV. 99 11 Wochen alt, 4140 g schwer auf die Klinik aufgenommen. Ausser einer Bronchitis und einer Leistenhernie an dem gut genährten Kinde nichts Besonderes. Bis zum 20. V. Ernährung: ¼ Milch (8 Mahlzeiten). Dabei täglich 4—5 mal Stuhl und mehrmals Erbrechen. Körpergewichtsabnahme auf 3530. Darauf Brusternährung: Weiter Magendarmerscheinungen und Abnahme auf 3050 am 3. VI. Dann allmähliche Reconvalescenz.

XVI. Reinhold St... Zwillingkind (ausgetragen) asphyktisch geboren, wird wegen eines Bruches mit 3¼ Monaten 3040 g schwer in die Poliklinik eingebracht, 3 Tage später mit einem Körpergewicht von 3140 g auf die Klinik aufgenommen. Ernährung: Erst ¼ Milch mit Wasser, dann mit Haferschleim. Im allgemeinen Körpergewichtsstillstand. 1—2 mal täglich Stuhl von deutlichem Fäulnisgeruch. — Stark abgemagertes Kind mit schlaffen Bauchdecken.

XVII. Oscar W... kam am 29. V. 99 in die Poliklinik, 4¼ Wochen alt, 4210 g schwer. Hatte bisher 8 mal täglich ⅔ Milch erhalten, ohne erhebliche Magendarmerscheinungen zu zeigen. Ernährung: 5 mal täglich ⅓ Milch. 14 Tage später schwere acute Magendarmkrankung. Nach 3 Tagen Aufnahme auf die Klinik. (Körpergewicht 4120). Anfangs Wasserdiät. Dann ⅓ Milch, später ¼ Milch. Abklingen der Magendarmerscheinungen, doch nach anfänglicher Abnahme bis auf 3880 anhaltender Gewichtsstillstand. — Es handelt sich um ein blasses acut abgemagertes Kind ohne positiven pathologischen Organbefund.

XVIII. Max Wo... Ammenkind, geboren den 30. III. 99. Zeigte sein ganzes Leben hindurch ein physiologisches Verhalten, abgesehen davon, dass es bisweilen unmittelbar nach dem Trinken ein wenig von der Mahlzeit erbrach. Die Ernährung bestand stets in 5 Mahlzeiten pro Tag.

Litteraturverzeichniss.

1. A. Keller. Malzsuppe, eine Nahrung für magendarmkranke Säuglinge. — Jena 1898. (Verlag von Gustav Fischer).
2. Stadthagen, Ueber das Vorkommen der Harnsäure in verschiedenen thierischen Organen, ihr Verhalten bei Leukämie und die Frage ihrer Entstehung aus den Stickstoffbasen. — Virchow's Archiv. Bd. 109.

3. Ken Taniguti, Ueber den Einfluss der Alkalien auf die Oxydationen im Organismus. — Virchow's Archiv Bd. 117.

4. Heffter, Die Ausscheidung des Schwefels im Harn. Pflüger's Archiv Bd. 38.

5. Javein, Zur Frage über den Einfluss des doppeltkohlensauren resp. citronensauren Natriums, in grossen Dosen gegeben, auf die Menge des neutralen Schwefels und der Aetherschwefelsäuren des Harns bei gesunden Menschen. — Zeitschr. f. Klin. Med. Bd. 22.

6. Rudenko, Ueber das Verhalten des neutralen Schwefels bei Stoffwechselstörungen und über die Oxydation derselben. Virchow's Archiv. Bd. 125.

7. Savelieff, über den Einfluss des Eiweisszerfalls auf die Ausscheidung des neutralen Schwefels. — Virchow's Archiv Bd. 136.

8. Harnack und Remertz, Ueber die Beeinflussung der Schwefel- und Stickstoffausscheidung durch das Chloralhydrat und Amylenhydrat. Fortschritte der Medicin Bd. 11, Nr. 7.

9. Reale und Boery, Ueber die Aenderungen im Stoffwechsel durch Sauerstoffmangel im Organismus. — Rivista clinic. et terap. 1. Mai 1894 (nach Maly's Jahresber. Bd. 24).

10. Biedert, Die Kinderernährung im Säuglingsalter. Stuttgart. (Verlag von Ferdinand Enke).

11. Thiemich. Ueber Leberdegeneration bei Gastroenteritis. — Ziegler's Beiträge z. patholog. Anatom. und allgem. Pathologie. Bd. XX.

12. Besnea, Le foie dans les dyspepsies gastro-intestinales chroniques des enfants. — Arch. des sciences med. mars 1899.

13. Terrien, Etude anatomo-pathologique du foie dans la gastroenterite des nourrissons. — Thèse de Paris, mars 1899.

14. Kunkel, Ueber den Stoffwechsel im Säugethierkörper. — Pflüger's Archiv Bd. 14.

15. Lépine (mit Guérin und Flavard), Sur un nouveau symptome de trouble de la fonction biliaire. — Revue de med. 1881.

16. Reale und Velardi, Ueber die Ausscheidung des neutralen Schwefels durch den Harn. — Studii di clinic. med. Napoli 1896 (nach Maly's Jahresber. Bd. 26).

17. J. Munk, Physiologisch-chemische Mittheilungen. — Virchow's Archiv Bd. 69.

18. Mester, Beiträge zur Kenntniss der Cystinurie. — Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XIV.

19. Kast und Mester, Ueber Stoffwechselstörungen nach länger dauernder Chloroformnarkose. — Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 18.

20. Beck und Benedikt, Ueber den Einfluss der Muskelarbeit auf die Schwefelausscheidung. — Pflüger's Archiv Bd. 54.

21. Stadthagen, Zur Kenntniss der Cystinurie. — Virchow's Archiv Bd. 100.

22. Salkowki, Ueber die Entstehung der Schwefelsäure und das Verhalten des Taurins im thierischen Organismus. Virchow's Archiv, Bd. 58.

23. J. Munk, Ueber den Einfluss angestrongter Körperarbeit auf die Ausscheidung der Mineralstoffe und der Aetherschwefelsäuren. — Du Bois-Reymond's Archiv, physiolog. Abtheil. 1895.

24. Benedikt, Ueber die Ausscheidung des Schwefels in pathologischen Zuständen. — Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 36.

25. Malerba, Sul contegno del sulfo proteico nell' organismo. — Rendic. d. R. Ac. Sc. fis. e matem. d. Napoli, Fasc. II, 1897.

26. Jakubowitsch, Von den quantitativen Bestandtheilen der Galle bei den Neugeborenen und Säuglingskindern. — Jahrbuch f. Kinderheilkunde, Bd. 24.

27. Baginski und Sommerfeld. Zur Chemie der kindlichen Galle. — Archiv f. Kinderheilkunde, Bd. 19.

28. Nencki und Zaleski, Ueber das Verhalten des Benzoyl- und des Calciumsuperoxyds im Verdauungskanal des Menschen und des Hundes. — Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII.

=====

Zur Kenntniss des durch Säuren abspaltbaren Stickstoffes der Eiweisskörper.

Von
Yandell Henderson.

(Aus dem Sheffield Laboratorium für physiologische Chemie, Yale University.)

(Der Redaction zugegangen am 1. November 1899.)

Nachdem von Hlasiwetz und Habermann¹⁾ nachgewiesen war, dass bei der Spaltung der Eiweisskörper durch starke Salzsäure ein Theil des im Eiweissmolekül enthaltenen Stickstoffs in Form von Ammoniak abgespalten wird, sind zuerst von Nasse²⁾ eine Reihe quantitativer Versuche angestellt worden, um die Menge des durch Säuren als Ammoniak abspaltbaren Stickstoffes zu erfahren. Es ergaben sich dabei starke Differenzen zwischen den verschiedenen zur Untersuchung herangezogenen Eiweisskörpern bezüglich des Gehaltes an «locker gebundenen Stickstoff». In letzter Zeit sind die Untersuchungen Nasse's von Hausmann³⁾ aufgenommen und wesentlich erweitert worden, da Hausmann nicht nur über den locker gebundenen, sondern auch über den als Diamino- und Monoaminostickstoff⁴⁾ austretenden Stickstoff der durch starke Salzsäure gesprengten Eiweisskörper Aufklärung zu geben versucht hat.

1) Hlasiwetz und Habermann, Ueber die Proteinstoffe, Liebig's Annalen, Band 169, neue Reihe 93, Seite 150—166.

2) Otto Nasse, Studien über die Eiweisskörper, Pflüger's Archiv, Band VII, Seite 139—158.

3) W. Hausmann, Ueber die Vertheilung des Stickstoffes im Eiweissmolekül, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Band XXVII, Seite 95.

4) Hausmann versteht unter Amidstickstoff denjenigen Stickstoff, den Nasse als «locker gebundenen Stickstoff» bezeichnet. Monoaminostickstoff ist der Stickstoff, der an Leucin, Tyrosin, Glutaminsäure u. s. w. gebunden ist, und Diaminostickstoff schliesslich ist der an die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen gekettete Stickstoff.

Diese Tafel zeigt die gefundenen Werthe für den Amidstickstoff,
als Procente des gesamten Stickstoffs berechnet.

Reagens.	H ₂ SO ₄							HCl						Hausmann ²⁾	Nasse	Pröschner ³⁾	Pick ⁴⁾
	5	10	10	15	20	40	20	concentrirt				25	20				
Kochdauer (Stunden)	5	10	40	15	20	20	450	7	7	20	40	50	96				
Fibrin (sorgfältig gereinigtes Präparat)	7,5	7,7	—	8,0	8,1	9,2	—	7,9	—	—	10,4	—	—	—	10,0	—	
Hämoglobin (aus Hund, zweimal umkrystallisirt)	4,6	4,8	—	5,0	—	5,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,3	
Edestin (krystallisirt aus Hanfsamen) .	9,7	9,2	11,0	9,9	9,9	10,5	—	9,7	9,7	10,2	11,2	—	—	—	—	—	
Eieralbumin (zweimal umkrystallisirt)	6,5	7,1	—	7,4	7,7	8,1	—	7,1	7,5	8,5	9,5	—	—	8,5	11,2	—	
Zein ⁵⁾ (aus Mais)	—	—	—	—	—	—	—	21,1	—	—	—	—	—	—	—	—	
Casein (nach Hammarsten)	9,8	10,2	—	10,9	9,9	10,4	—	10,2	—	10,6	—	—	—	—	—	—	
Casein (Handels-)	—	—	—	—	—	—	—	10,0	10,1	—	12,0	13,3	—	13,3	12,5	—	
Serumalbumin ⁵⁾ (Handels-)	—	—	—	—	—	—	—	6,2	—	—	—	—	—	6,3	8,9	—	
Leim (Handels-)	—	—	—	—	—	—	—	1,1	1,0	—	1,9	2,6	—	1,6	3,3	—	
Ovomucoid ⁵⁾	—	—	—	—	—	—	—	17,0	—	—	—	—	—	—	—	—	

Die von ihm im Laufe seiner Untersuchungen gefundenen Zahlen scheint Hausmann als feststehende zu betrachten, und namentlich bezeichnet er die Menge des durch Säuren absprengbaren Amidstickstoffes «als eine scharf bestimmbare und für die einzelnen Eiweisskörper sehr charakteristische Grösse».

Mir schien nun, entgegen den Angaben von Hausmann die Möglichkeit, dass die Concentration der zur Spaltung verwendeten Säuren sowie die Dauer ihrer Einwirkung auf die Vertheilung des Stickstoffes doch von Einfluss sein konnte, nicht ausgeschlossen.

Ich habe daher eine Reihe von Versuchen ausgeführt, in denen ich sorgfältig gereinigte Eiweisskörper mit Salzsäure und Schwefelsäure verschiedener Concentration verschieden lange Zeit kochte.¹⁾ Die angestellten Versuche bestätigten meine Voraussetzung vollkommen, wie aus vorstehender (S. 48-49) Tabelle ersichtlich ist. Am klarsten treten die Verhältnisse in den Versuchen hervor, in welchen ich die Eiweisskörper mit Schwefelsäure behandelte. Hier zeigt sich ausserordentlich deutlich die Abhängigkeit der abspaltbaren Menge des Amidstickstoffes von der Kochdauer resp. der Concentration der zur Spaltung verwendeten Säure. Aber auch bei Verwendung von Salzsäure als Spaltungsmittel ergeben sich ähnliche Resultate.

In meinen Versuchen habe ich mich auf die Bestimmung des unter verschiedenen Bedingungen abspaltbaren Amidstickstoffes beschränkt. Aber da die für dieselben gefundenen Zahlen entgegen den Angaben Hausmann's als abhängig von den Versuchsbedingungen sich erweisen, so ist klar, dass jede Zu- oder Abnahme des Amidstickstoffes auch die Zahl für den Diamino- oder Monoaminostickstoff resp. beide beeinflussen muss. Die Angaben für den Monoamino- resp. Diaminostickstoff können demnach auch nur unsichere und nicht feststehende sein. Ich habe deshalb verzichtet, betreffs des Mono- und Diaminostickstoffes quantitative Untersuchungen anzustellen.

¹⁾ Ich benutzte hier die von Hausmann angegebene Methode. loc. cit.

Ueber die Bindungsweise des Stickstoffs in primären Albumosen.

Von
Ernst Friedmann.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 3. November 1899.)

Im Anschluss an die von Pick jüngsthin veröffentlichte Arbeit «Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins»¹⁾ möchte ich kurz über einige Versuche berichten, die ich im Sommersemester 1898 auf Veranlassung von Herrn Professor Siegfried ausgeführt habe. Mir wurde die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, ob die nach Kühne und Chittenden²⁾ dargestellten Albumosen als chemische Individuen anzusprechen wären und, wenn dies der Fall sein sollte, Unterschiede ausfindig zu machen, die einen Einblick in den verschiedenen Bau dieser Körper gestatteten.

Bei der Beantwortung dieser Frage nahm das Studium der Bindungsweise des Stickstoffs einen breiten Raum ein. Denn die quantitative Vertheilung des Stickstoffs auf die einzelnen Atomcomplexe konnte leicht einen Massstab sowohl für die Einheitlichkeit des Materials als auch für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Albumosen abgeben. Es ist dies derselbe Gedankengang, den gleichzeitig mit mir Hausmann³⁾

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 28, S. 219.

2) Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXVIII, S. 11.

3) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 95.

bei der Charakterisirung verschiedener thierischer Eiweisskörper verfolgt hat und später Pick¹⁾ bei der der Albumosen. Aehnlich wie sie suchte ich den locker gebundenen Stickstoff zu bestimmen, ferner den Basenstickstoff (Hausmann's Diaminostickstoff) und schliesslich den Säurenstickstoff (Hausmann's Monoaminostickstoff).

Als Ausgangsmaterial dienten mir Albumosen, die durch Verdauung von Fibrin dargestellt waren und nach den Vorschriften der Kühne'schen Schule isolirt wurden. Sie zeigten die von Kühne und Neumeister²⁾ angegebenen Reactionen. Ich möchte nur hervorheben, dass die von mir erhaltene Protoalbumose nicht wie die von Pick erhaltene schwach sauer, sondern neutral reagirte, aber schon nach einmaligem Aufkochen in wässriger Lösung deutlich saure Reaction zeigte.

Bestimmung des locker gebundenen Stickstoffs.

Zur Bestimmung des locker gebundenen Stickstoffs erhitzte ich die Albumosen im Vacuum mit Alkali und fing das ausgetriebene Ammoniak über titrirter Schwefelsäure auf. Ich benutzte hierbei einen Apparat, der ähnlich dem von Nencki³⁾ angegebenen construirt war. Im Anfang wurde mit Magnesia destillirt und dann dieselbe Flüssigkeit noch einmal mit Kalk. Es hatte sich nämlich herausgestellt, dass, nachdem man mit Magnesia kein Ammoniak mehr austreiben konnte, eine weitere Abspaltung von Ammoniak bis zu einem bestimmten Endpunkte durch Kalk erfolgte. Die Temperatur bei diesen Destillationen überstieg nicht 35°. Da es möglich war, dass beim Trocknen der Substanz bis zum constanten Gewicht bei 100° Ammoniak entweichen konnte, so wurde die abgewogene Menge in Wasser gelöst, die Lösung auf 100 ccm. aufgefüllt, und in je 20 ccm. der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl zwei Mal bestimmt. Mit dem Rest wurde die Destillation in der oben angegebenen Weise vorgenommen.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 219.

2) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 20, S. 11, Bd. 24, S. 261, Bd. 26, S. 324.

3) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmac., Bd. 36, S. 385.

Bei der Protoalbumose A¹⁾ erhielt ich folgende Werthe:

20 ccm. der Lösung lieferten 0,04963 g N } 0,04979 g N,
 20 „ „ „ „ 0,04995 g N }
 50 „ „ „ mit Magnesia destillirt, lieferten 0,00227 g N,
 darauf mit Kalk destillirt, lieferten 0,01000 g N.

Oder in Procenten des gefundenen Stickstoffgehaltes ausgedrückt:

100 ccm. der Lösung enthielten 0,24895 g Gesamtstickstoff = 100 %/
 100 „ „ „ „ 0,00454 g durch Magnesia abspaltbaren
 Stickstoff = 1,82 %/
 100 ccm. der Lösung enthielten nach der Destillation mit Magnesia
 0,02000 g durch Kalk abspaltbaren Stickstoff = 8,03 %/
 100 ccm. der Lösung enthielten 0,02454 g locker gebundenen Stickstoff
 = 9,85 %/.

Die Heteroalbumose A gab nachstehende Zahlen:

20 ccm. der Lösung lieferten 0,01991 g N } 0,02005 g N,
 20 „ „ „ „ 0,02019 g N }
 60 „ „ „ mit Magnesia destillirt, lieferten 0,00361 g N,
 darauf mit Kalk destillirt, lieferten 0,00062 g N.

In Procenten des gefundenen Stickstoffgehaltes ausgedrückt:

100 ccm. der Lösung lieferten 0,10025 g Gesamtstickstoff = 100 %/
 100 „ „ „ „ 0,00600 g durch Magnesia abspaltbaren
 Stickstoff = 5,99 %/
 100 ccm. der Lösung lieferten nach der Destillation mit Magnesia 0,00105 g
 durch Kalk abspaltbaren Stickstoff = 1,04 %/
 100 ccm. der Lösung lieferten 0,00700 g locker gebundenen Stickstoff
 = 7,03 %/.

	Durch Magnesia abspaltbarer N	Nach der Destillation mit Magnesia durch Kalk abspaltbarer N	Summe des locker gebundenen N
Protoalbumose A	1,82 %	8,03 %	9,85 %
Heteroalbumose A	5,99 %	1,04 %	7,03 %

Aus diesen Zahlen scheint hervorzugehen, dass die nach Kühne dargestellte Protoalbumose mehr locker gebundenen Stickstoff enthält, als die Kühne'sche Heteroalbumose; aber während man aus der Protoalbumose nur ungefähr $\frac{2}{3}$ des

1) Die hinter den Namen der Albumosen gesetzten grossen Buchstaben bedeuten Präparate verschiedener Darstellung.

locker gebundenen Stickstoffs durch Magnesia abspalten kann, giebt die Heteroalbumose ungefähr $\frac{6}{7}$ durch Destillation mit Magnesia ab.

Es liegt nahe, anzunehmen, dass der nach Pick¹⁾ bei der Proto- und Heteroalbumose nach einer anderen Methode bestimmte « Amidstickstoff » derselbe ist, wie der durch Destillation mit Magnesia und Kalk abgespaltene Stickstoff. Pick erhielt für die Protoalbumose 7,14% Amidstickstoff und für die Heteroalbumose 6,45% Amidstickstoff. Der letztere Werth deckt sich mit dem von mir erhaltenen, während der von mir für die Protoalbumose gefundene Werth nicht unwesentlich von dem von Pick beobachteten abweicht. Es liegt das wohl daran, dass es eben nach der Kühne'schen Methode wohl möglich ist, eine reine Heteroalbumose zu bekommen, wie dies auch Pick hervorhebt,²⁾ nicht aber eine reine Protoalbumose.

Wenn aber wirklich der von Pick bestimmte Amidstickstoff derselbe ist, wie der durch Destillation mit Magnesia und Kalk abgespaltene Stickstoff, was sehr wahrscheinlich ist, so ist die von Hausmann³⁾ ausgearbeitete und von Pick benutzte Methode der von mir angewandten entschieden vorzuziehen. Denn die Ammoniakabspaltung aus den unzersetzen Albumosen durch Destillation mit Kalk und Magnesia ist ein Process, der nur sehr langsam verläuft, und es erfordert manchmal ein Kochen durch mehrere Tage hindurch, ehe die Reaction ihren Endpunkt erreicht. Nachstehende Tabellen lassen diese Verhältnisse deutlich erkennen. Sie zeigen ebenfalls, dass die Reaction durch Destillation mit Magnesia zu einem ersten Endpunkt kommt und darauf durch Destillation mit Kalk zu einem zweiten.

Die erste Tabelle bezieht sich auf die oben erwähnte Destillation der Protoalbumose A, die zweite auf die gleichfalls erwähnte Destillation der Heteroalbumose A.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 256.

2) l. c. S. 235.

3) l. c. S. 98.

Protoalbumose A.

50 ccm. gaben mit	Magnesia nach	6 Stunden	0,00177 g NH ₃ ab,
50	» » » » » weiteren	6	» 0,00049 » » »
50	» » » » » »	6	» 0,00049 » » »
50	» » » » » »	6	» 0,00000 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00000 » » »
50	» » » Kalk » »	6	» 0,00114 » » »
50	» » » » » »	6	» 0,00190 » » »
50	» » » » » »	6	» 0,00117 » » »
50	» » » » » »	6	» 0,00105 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00124 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00092 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00066 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00078 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00056 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00065 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00053 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00024 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00043 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00032 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00022 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00029 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00003 » » »
50	» » » » » »	3	» 0,00000 » » »

Heteroalbumose A.

60 ccm. gaben mit	Magnesia nach	2 Stunden	0,00340 g NH ₃ ab,
60	» » » » » weiteren	3	» 0,00053 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00002 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00017 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00019 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00007 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00002 » » »
60	» » » Kalk » »	3	» 0,00024 » » »
60	» » » » » »	4	» 0,00003 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00048 » » »
60	» » » » » »	3	» 0,00000 » » »

Bestimmung des Basenstickstoffs und des Säurenstickstoffs.

Zur Feststellung des Verhältnisses vom Basenstickstoff zum Säurenstickstoff erhitzte ich die bei 105° getrockneten Albumosen im geschlossenen Rohr mit Salzsäure. Gebraucht wurden 20 ccm. concentrirter Salzsäure; die Dauer des Er-

hitzens betrug 5—6 Stunden; die Temperatur überstieg nicht 130°. Die braune Zersetzungsflüssigkeit enthielt geringe Mengen einer ungelösten dunkel gefärbten Substanz — vielleicht Schmiedeberg's Melanoidinsäure¹⁾ —, von der sie durch Filtration getrennt wurde. Im Filtrat wurden die Basen durch Phosphorwolframsäure gefällt, der voluminöse Niederschlag abfiltrirt und mit einem Waschwasser, das auf 100 Theile Wasser 10 Theile Phosphorwolframsäure und 5 Theile Schwefelsäure enthielt, bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen. Bestimmt wurde der Stickstoffgehalt des Ungelösten, des Phosphorwolframsäure-Niederschlages und des Filtrats hiervon. Da zum Filtriren des Phosphorwolframsäure-Niederschlages sehr grosse Filter benutzt waren, und das Verbrennen der letzteren Schwierigkeiten bereitete, so wurde der Niederschlag in verdünnter heisser Natronlauge gelöst, und in dieser Lösung der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Bestimmung des Stickstoffs des Ungelösten.

Protoalbumose A	0,5549 g gaben	0,00172 g N =	0,31% N
	0,4042 „ „	0,00113 „ „	= 0,28% „
Protoalbumose B	0,4400 „ „	0,00076 „ „	= 0,17% „
Heteroalbumose B	0,5718 „ „	0,00144 „ „	= 0,25% „
	0,5250 „ „	0,00158 „ „	= 0,30% „
	0,3287 „ „	0,00174 „ „	= 0,53% „

Bestimmung des Basenstickstoffs.

Protoalbumose A	0,5549 g gaben	0,03269 g N =	5,89% N
	0,4042 „ „	0,01904 „ „	= 4,71% „
Protoalbumose B	0,4400 „ „	0,02246 „ „	= 5,11% „
Heteroalbumose B	0,5718 „ „	0,03510 „ „	= 6,14% „
	0,5250 „ „	0,03589 „ „	= 6,89% „
	0,3287 „ „	0,01933 „ „	= 5,88% „

Bestimmung des Säurenstickstoffs.

Protoalbumose A	0,5549 g gaben	0,05937 g N =	10,70% N
	0,4042 „ „	0,04788 „ „	= 11,85% „
Protoalbumose B	0,4400 „ „	0,04915 „ „	= 11,17% „
Heteroalbumose B	0,5718 „ „	0,05653 „ „	= 9,87% „
	0,5250 „ „	0,05120 „ „	= 9,75% „
	0,3287 „ „	0,03445 „ „	= 10,48% „

1) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. XXXIX, S. 1.

Zusammenstellung.

Substanzmenge	N-Gehalt des Ungelösten in %		Basen-N in %		Säuren-N in %		Summe vom N-Gehalt des Ungelösten + Basen-N + Säuren-N		Mittel des N-Ge- haltes der Sub- stanz ¹⁾
		Im Mittel				Im Mittel		Im Mittel	
Protoalbumose A 0,5549 g	0,31		5,89		10,70		16,90		
0,4042 »	0,28	0,25	4,71	5,24	11,85	11,24	16,84	16,87	16,80
Protoalbumose B 0,4400 »	0,17		5,11		11,17		16,45	16,45	16,89
Heteroalbumose B 0,5718 »	0,25		6,14		9,87		16,26		
0,5250 »	0,30	0,36	6,84	6,27	9,75	10,03	16,89	16,66	16,89
0,3287 »	0,53		5,84		10,48		16,85		

Diese Zusammenstellung zeigt zunächst, dass der Stickstoff des Ungelösten nicht zu vernachlässigen ist. Seine Menge ist bei den Albumosen stets grösser als der von Hausmann²⁾ für Eiweisskörper für den ungünstigsten Fall berechnete Werth von 0,16%. Ferner scheint aus den mitgetheilten Zahlen hervorzugehen, dass die Heteroalbumose reicher an Basenstickstoff als die Protoalbumose ist und dementsprechend ärmer an Säurenstickstoff, oder, um mich der Ausdrucksweise von Hausmann und Pick zu bedienen, mehr Diamino- und daher auch weniger Monoaminostickstoff enthält, ein Resultat, das mit dem von Pick erhaltenen übereinstimmt.

Vielleicht ist es von einigem Interesse, die von Pick erhaltenen Zahlen mit den meinigen zusammenzustellen. Um die in Betracht kommenden Verhältnisse vergleichen zu können, will ich die erhaltenen Mittelwerthe in Procenten des Stickstoffgehaltes der untersuchten Körper ausdrücken.

1) Die hier angegebenen Zahlen sind Mittelwerthe von Doppelbestimmungen der bei 105° getrockneten Albumosen.

2) Hausmann, l. c. S. 100.

	Basen-N	Säuren-N
Pick: Protoalbumose	25,42	68,17
Friedmann: Protoalbumose	31,12	66,85
Pick: Heteroalbumose	38,93	57,40
Friedmann: Heteroalbumose	37,14	59,41

Auch aus diesen Zahlen geht hervor, dass die nach Kühne dargestellte Heteroalbumose einen hohen Grad von Reinheit besitzt, denn die von Pick und mir für den Basenstickstoff und den Säurenstickstoff erhaltenen Zahlen stimmen miteinander überein. Der hohe Werth, den ich für den Basenstickstoff der Protoalbumose erhielt, erklärt sich daraus, dass die nach Kühne dargestellte Protoalbumose eben nicht frei von Heteroalbumose zu erhalten ist, und letztere viel reicher an Basenstickstoff ist als die Protoalbumose. Bei Pick liegen daher auch die Mittelwerthe des Basenstickstoffs für Proto- und Heteroalbumose um 13,51%, bei mir dagegen nur um 6,02% auseinander. Da aber die Differenzen zwischen den einzelnen Bestimmungen des Basenstickstoffs bei mir sehr nahe an diesen Werth heranreichen, so habe ich die erhaltenen Zahlen bisher nicht veröffentlicht. Auch Pick hat in einem Falle eine ähnliche Differenz bekommen, jedoch ist sie für seine Zahlen von geringerer Bedeutung, weil bei ihm die Mittelwerthe um das Doppelte auseinander liegen.

Eine Erklärung für die ziemlich grossen Fehlergrenzen innerhalb der einzelnen Bestimmungen habe ich darin zu sehen geglaubt, dass der Phosphorwolframsäure-Niederschlag nicht vollständig unlöslich ist.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Siegfried, in dessen Laboratorium die Versuche ausgeführt wurden, für seine mir gewährte Hülfe meinen besten Dank auszusprechen.

Ueber die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure.

Von

Dr. Paul Mayer,

Vol.-Assistenten der I. med. Universitätsklinik in Berlin.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 12. November 1899.)

Seitdem durch die Auffindung einer Pentose im Harn durch Salkowski und Jastrowitz¹⁾ zum ersten Male der Nachweis erbracht wurde, dass Kohlehydrate mit fünf Atomen Kohlenstoff, denen man bisher nur im Pflanzenreiche begegnet war, auch im thierischen Körper eine Rolle spielen, haben verschiedene Forscher über das Vorkommen von Pentosen im Organismus eingehende Studien angestellt. Besonders die Untersuchungen von Kossel, Hammarsten, Salkowski und Blumenthal, denen sich Arbeiten von Neumann, Bang, Oswald und Notkin anschliessen, haben gezeigt, dass eine Reihe von Nucleoproteiden eine Pentosegruppe enthalten.²⁾ Indes der Nachweis, dass das fragliche Kohlehydrat eine echte Pentose sei, war zunächst nur durch die Schmelzpunktbestimmung des betreffenden Osazons geführt worden; und es wurden daher bald Zweifel laut, ob es gestattet sei, aus der

1) Salkowski und Jastrowitz, Centralbl. für die med. Wissenschaften, 1892, Nr. 19 u. 35.

2) Kossel, Arch. f. Anat. u. Physiol., 1893, S. 157.

Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIX, 1894, S. 28.

Salkowski, Berlin. klin. Wochenschr., 1895, Nr. 17.

Blumenthal, Zeitschr. f. klinische Medicin, Bd. 34, 1898.

Neumann, Engelmann's Arch. f. Physiologie, 1898, S. 374.

Bang, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVI, 1898, S. 133.

Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVII, 1899, S. 14.

Notkin, Virchow's Archiv, 144. Suppl., 1896, S. 236.

Schmelzpunktbestimmung des Osazons allein bindende Schlüsse auf die Natur eines Kohlehydrates zu ziehen, und besonders darauf hingewiesen, dass es sich in den genannten Fällen auch um Glycuronsäure handeln könne, die ja viele gemeinsame Eigenschaften mit den Pentosen zeigt. Nun liegen allerdings heute für das Osazon aus dem Harn und für das Osazon aus Pankreas Elementaranalysen vor, so dass für diese Körper die Pentosennatur festgestellt ist.¹⁾ Immerhin könnten, da über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure eine einheitliche Auffassung bis nun nicht erzielt ist, Elementaranalysen dieser letzteren ähnliche Zahlen ergeben. Es erschien daher geboten, die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure eingehend zu studiren. Ich habe deshalb, als ich auf Anregung von Herrn Professor Salkowski begann, mich mit der Glycuronsäure zu beschäftigen, auch dieser Frage mein Interesse zugewendet.

Die einzigen zuverlässigen Angaben über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure rühren von Thierfelder²⁾ her, dem wir die ersten eingehenden chemischen Untersuchungen über die Glycuronsäure überhaupt verdanken. Thierfelder stellte fest, dass das Glycuronsäureanhydrid bei der Behandlung mit Phenylhydrazin nur braune, allmählich zu Boden sinkende Tröpfchen und zähe, schwarze Massen bildet. Dagegen konnte er aus den Alkalisalzen der Säure eine Phenylhydrazinverbindung darstellen, die sich langsam in gelben, sich allmählich bräunenden Nadeln abscheidet, welche einen Schmelzpunkt von 114—115° zeigen. Die Analyse seiner Verbindung ergab, dass es sich um ein Gemisch von Osazon und Hydrazinsalz handelte, beziehungsweise um eine Verbindung beider nach gleichen Molekülen.

Weitere Angaben über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure finden sich bei Geyer³⁾ und Hirschl.⁴⁾

1) Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. a. a. O. und Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVII, 1899, S. 537.

2) Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XI, 1887, S. 395.

3) Geyer, Wiener med. Presse, 1889, Bd. 30, S. 1686.

4) Hirschl, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, 1890, S. 377.

Diese Autoren haben jedoch ihre Untersuchungen lediglich von dem einen Gesichtspunkt aus unternommen, ob die zum Nachweis von Zucker im Harn ausgeführte Phenylhydrazinprobe unbedingt eindeutig sei und nicht zu Verwechslungen mit etwa im Harn vorkommenden Glycuronsäureverbindungen Anlass geben könne. Sie haben daher das Hauptgewicht auf die Krystallform der betreffenden Verbindungen gelegt, ohne eingehende systematische Untersuchungen angestellt zu haben.

Während Geyer nur angibt, dass die gewonnenen Krystalle sich weder in der Form noch in ihren Löslichkeitsverhältnissen von denen des Phenylglucosazons unterscheiden, aber nicht einmal Schmelzpunktbestimmungen der erhaltenen Verbindungen gemacht hat, werden solche wenigstens von Hirschl mitgeteilt, wenn er auch sonst keine genauen Angaben über die Mengenverhältnisse der angewandten Substanzen macht. Hirschl erhielt beim Erhitzen von 10 ccm. einer Lösung von glycuronsaurem Natron (wie viel?) in einer Eproutette mit 2 Messerspitzen salzsauren Phenylhydrazins und 3 Messerspitzen essigsäuren Natrons durch eine Viertelstunde im Wasserbad hellgelbe, in Wasser unlösliche Nadeln, die zwischen 110 und 114° schmolzen; kochte er eine halbe Stunde lang, so erhielt er einen braungelben, amorphen Niederschlag, der aus gelben, unregelmässigen Schollen bestand und einen Schmelzpunkt von 107—108° zeigte, während nach einstündigem Erhitzen dieselben amorphen Körnchen auftraten, die einen Schmelzpunkt von 150° zeigten. Ich glaube nicht, dass diese Angaben geeignet sind, die Verhältnisse wesentlich zu klären.

Bereits in einer früheren Arbeit habe ich mitgeteilt, dass ich aus verschiedenen glycuronsäurehaltigen Lösungen Phenylhydrazinverbindungen von verschiedenem Schmelzpunkt erhalten habe.¹⁾ Ich habe auch betont, dass die Verhältnisse bei der Glycuronsäure ungleich complicirter liegen als bei den Zuckerarten, da sie ausser der Aldehydgruppe noch eine Carboxylgruppe enthält. Während bei den Zuckern unter der

1) Paul Mayer, Berl. klin. Wochenschr., 27 u. 28, 1899.

den noch feuchten Rückstand in kohlensaurem Ammon zu lösen, in welchem das Euxanthon unlöslich ist. Nach dem Filtriren wird die Euxanthinsäure durch HCl wieder ausgefällt und dann aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt. Auf diese Weise erhielt ich die Euxanthinsäure in prachtvollen goldgelben Krystallen vom Schmelzpunkt 162°. Behufs Abspaltung der Glycuronsäure aus der Euxanthinsäure hat Thierfelder¹⁾ die Euxanthinsäure im Papin'schen Topf mit 100—200 Theilen Wasser auf 100—125° erhitzt, während Mann und Tollens²⁾ die Spaltung mit 1%iger H₂SO₄ vornahmen.

Nachdem ich mich überzeugt hatte, dass das letztere Verfahren eine bedeutend bessere Ausbeute gibt, habe ich jedes Mal die Spaltung mit 1%iger H₂SO₄ ausgeführt. Es wurden 50 g Euxanthinsäure mit 700 ccm. einer 1%igen H₂SO₄ im Autoclaven in der Weise erhitzt, dass während der ersten Stunde der Druck langsam auf 2½—3 Atmosphären stieg und während der zweiten Stunde auf dieser Höhe erhalten wurde.

Nach diesem von Mann und Tollens angegebenen Verfahren erhielt ich aus 50 g Euxanthinsäure eine Lösung, die nach der polarimetrischen Bestimmung circa 20 g Glycuronsäure enthielt. Da die Krystallisation des Glycuronsäureanhydrids beziehungsweise einzelner glycuronsaurer Salze Schwierigkeiten machte, zog ich es vor, die glycuronsäurehaltigen Lösungen direkt zu verarbeiten. Denn für die Untersuchung der Phenylhydrazin-Verbindungen musste es gleichgültig sein, ob glycuronsaure Salze in krystallinischem Zustand verwendet würden, oder eine reine, glycuronsäurehaltige Lösung, da ja auch bei den ersteren nur die aus ihren Salzen frei gemachte Glycuronsäure in Wirksamkeit tritt.

Die nach der Spaltung vom Euxanthon abfiltrirte Lösung, welche natürlich alle der Glycuronsäure zukommenden Eigenschaften zeigte, wurde mit Natriumcarbonat neutralisirt und mit Essigsäure schwach angesäuert. Der Gehalt der so gewonnenen Lösung an Glycuronsäure wurde polarimetrisch bestimmt unter

1) Thierfelder, a. a. O., S. 391.

2) Mann u. Tollens, Annal. d. Chem., 290, 1896.

Zugrundelegung der von Thierfelder und Külz gefundenen spezifischen Drehung $[\alpha]_D = 19,4$.¹⁾ Da mich frühere orientierende Untersuchungen, wie ich bereits erwähnt habe, es für wahrscheinlich halten liessen, dass mehrere Phenylhydrazin-Verbindungen der Glycuronsäure existiren, bin ich so vorgegangen, dass ich successive 1, 2, 3 und 4 Moleküle Phenylhydrazin auf je ein Molekül Glycuronsäure zur Einwirkung brachte.

I.

1 Molekül Glycuronsäure. — 1 Molekül Phenylhydrazin.

Eine Lösung von 3 g Glycuronsäure wird mit 1,7 g in dem gleichen Volumen 50%iger Essigsäure gelöstem Phenylhydrazin versetzt (1 g Glycuronsäure entspricht 0,55 g Phenylhydrazin). Es entsteht sofort eine rothbraune Trübung, die sehr rasch eine zinnoberrothe Färbung annimmt, und es scheidet sich fast momentan ein rother flockiger Niederschlag aus. Die Untersuchung dieses bereits in der Kälte ausfallenden Körpers ergab kein positives Resultat. Er ist in heissem Wasser unlöslich und zersetzt sich beim Erhitzen zu einer braunschwarzen, schmierigen Masse. In heissem 90%igen Alkohol löst er sich ziemlich schwer und fällt auch nach dem Umkrystallisiren wieder als amorphe, rothe Verbindung aus, die sich bei 100° zu zersetzen beginnt und zwischen 105 und 110° schmilzt. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich annehme, dass dieser sich beim Erhitzen sofort zersetzende Körper die Ursache ist der harzigen, zähen Schmierien, die beim Einwirken von Phenylhydrazin auf Glycuronsäure so häufig auftreten. Bevor ich daher die mit Phenylhydrazin versetzte Lösung erhitzte, habe ich stets von diesem rothflockigen Niederschlag, dessen Abscheidung bald vollendet ist, abfiltrirt. Die filtrirte Lösung wird nun im Wasserbad erwärmt. Wenn man das Becherglas etwa eine halbe Stunde im Wasserbad belässt, so beginnt alsbald eine massenhafte Ausscheidung von Krystallen,

¹⁾ Thierfelder a. a. O. — Külz, Zeitschr. f. Biologie, 23. 475. 1887.

deren Isolirung und Reinigung jedoch durch die Beimengung zahlreicher Verunreinigungen sehr erschwert ist. Am zweckmässigsten erwies es sich mir, folgendermassen zu verfahren: Die Erhitzung im Wasserbad wird nur so lange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit eine vollkommen undurchsichtige Beschaffenheit angenommen hat, am besten, bis sich gerade die ersten Krystalle abzuscheiden beginnen, was nach etwa 15 Minuten der Fall ist. Bei einiger Uebung lässt sich dieser Punkt sehr leicht erkennen. Dann wird eventuell unter Benutzung des Heisswassertrichters durch ein Faltenfilter filtrirt, und im Filtrat scheiden sich momentan die schönsten, lichtgelben Krystalle aus, die in einer ganz klaren, gelben Lösung suspendirt sind. Die Krystalle werden abfiltrirt, noch besser an der Saugpumpe abgesaugt und über H_2SO_4 getrocknet. Mikroskopisch betrachtet, stellen sie kleinere oder grössere Nadeln dar, welche denen des Glucosazons ausserordentlich ähnlich sind. Häufig sieht man ganz dieselben grossen, charakteristischen, zu Büscheln angeordnete Nadeln, wie sie dem Glucosazon eigenthümlich sind. Auch in seinen Löslichkeitsverhältnissen zeigt die Verbindung dem Glucosazon gegenüber keinen Unterschied. Sie ist unlöslich in heissem Wasser und in kaltem absoluten Alkohol und lässt sich aus verdünntem Alkohol umkrystallisiren. Ihre Lösung in Eisessig dreht die Ebene des polarisirten Lichtes nach links. Vor dem Umkrystallisiren zeigten die verschiedenen Verbindungen, die ich erhielt, einen Schmelzpunkt von $199-205^\circ$, so dass sie sich auch hierin ganz wie Glucosazon verhält. Nach wiederholtem Umkrystallisiren gelingt es allerdings, den Schmelzpunkt bis auf $210-217^\circ$ zu erhöhen.

Die Elementaranalyse ¹⁾ ergab folgendes Resultat :

Substanz 0,1989, Gef. CO_2 0,4371.

H_2O 0,1188.

Hieraus folgt: C = 59,93 %.

H = 6,63 %.

Die N-Analyse ergab N = 15,52 %.

¹⁾ Für die Ausführung der in dieser Arbeit vorkommenden Elementaranalysen bin ich Herrn C. Neuberg, dem Assistenten des Laboratoriums, zu grossem Danke verpflichtet.

Diese Zahlen stimmen für keine der oben beschriebenen möglichen Verbindungen. Dagegen zeigen sie eine auffallende Uebereinstimmung mit der elementaren Zusammensetzung des Glucosazons, für welches folgende Zahlen gefordert werden:

C = 60,34%; H = 6,15%; N = 15,64%.

Selbstverständlich kann die erhaltene Verbindung, trotzdem sie dieselben Eigenschaften und sogar dieselbe Zusammensetzung wie das Glucosazon zeigt, nicht mit diesem identisch sein. Da die Lösung ausser der Glycuronsäure kein Kohlehydrat enthält, ist es zweifellos, dass der gewonnene Körper eine Phenylhydrazin-Verbindung der Glycuronsäure darstellt.

II.

1 Molekül Glycuronsäure — 2 Moleküle Phenylhydrazin.

Eine Lösung von 3 g Glycuronsäure wird mit 3,5 g in 50%iger Essigsäure gelöstem Phenylhydrazin versetzt. Sofort beim Mischen der Lösungen entsteht eine weisse, momentan in gelbroth übergehende Trübung, die alsbald eine zinnoberrothe Farbe annimmt. Auch hier scheidet sich, allerdings erst nach einigem Stehen, ein rother flockiger Niederschlag ab, der sich aber nicht isoliren lässt, sondern sich beim Stehen nach kurzer Zeit an den Wandungen des Becherglases als schmierige, braunschwarze Masse festsetzt.

Es handelt sich also offenbar um denselben Körper wie bei den ersten Versuchen, der sich bei Anwesenheit von etwas mehr Phenylhydrazin bereits spontan zersetzt und verharzt. Die filtrirte Lösung wurde nun genau so behandelt, wie ich es für die obigen Untersuchungen beschrieben habe. Ich erhielt so eine Verbindung, deren Löslichkeit in Wasser weit grösser war als die der ersten, so dass ein grosser Theil erst nach dem Erkalten ausfiel. Sie lässt sich ebenfalls aus verdünntem Alkohol umkrystallisiren, ist aber in absolutem Alkohol nicht unlöslich. Die Krystallform dieses Körpers war eine sehr wechselnde. Meist sah man kleine, zu Rosetten angeordnete Nadeln, oder Balken, bisweilen krystallisirte er in Stechapfelform und Drusen. Nicht selten fiel die Verbindung nach dem

Umkrystallisiren amorph oder gar gallertartig aus. Wovon diese physikalischen Verhältnisse abhängen, ist schwer zu sagen. Meist gelingt es allerdings auch dann noch, nach wiederholtem Umkrystallisiren eine krystallinische Verbindung zu erhalten. Es zeigt aber diese Beobachtung von Neuem, wie wenig Werth man auf die Krystallform der Phenylhydrazin-Verbindungen legen darf. Der Schmelzpunkt der gewonnenen Verbindung liegt bei $159\text{--}164^{\circ}$ — ein Schmelzpunkt, der mit dem der Pentosazone vollkommen übereinstimmt. Dass aber ein solches nicht vorliegt, ergibt die Elementaranalyse:

Substanz 0,1510 g, Gef. CO_2 0,3491 g, H_2O 0,0820 g.

Substanz 0,2008 g, N 19,6 ccm. (17° , 770 mm.).

Hieraus folgt: C = 63,05%

H = 6,03%

N = 11,5 %.

Schon der N-Gehalt zeigt, dass es sich nicht um Pentosazon handeln kann, dem ein N-Gehalt von 17,07% zukommt. Ich bin aber ausser Stande, zu sagen, welche Phenylhydrazin-Verbindung der Glycuronsäure hier vorliegt, da die Analyse keine für eine der möglichen Verbindungsformen genau stimmenden Zahlen ergeben hat.

III.

1 Molekül Glycuronsäure — 3 und 4 Moleküle Phenylhydrazin.

Bei Einwirkung von 3 und 4 Molekülen Phenylhydrazin auf 1 Molekül Glycuronsäure erhielt ich stets dieselbe Verbindung wie bei Einwirkung von 2 Molekülen Phenylhydrazin, also die Verbindung vom Schmelzpunkt $159\text{--}164^{\circ}$. Ein Unterschied in dem Ablauf des Processes zeigt sich nur insofern, als der rothe flockige Niederschlag jetzt überhaupt nicht mehr auftritt, sondern sich beim Stehen der Lösung die bekannten schwarzbraunen Schmierien absetzen.

Wenn ich die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfasse, so hat sich herausgestellt, dass die Glycuronsäure mit dem Phenylhydrazin zwei verschiedene Verbindungen liefert, von denen die eine die Eigenschaften und die Zusammensetzung des Hexosazons besitzt, und die andere den Schmelzpunkt des Pentosazons zeigt.

Bei den nahen Beziehungen der Glycuronsäure sowohl zu den Hexosen wie zu den Pentosen erscheint mir diese Tatsache von grosser Bedeutung zu sein, um so mehr, als die Glycuronsäure, wie ich dies in meiner früheren Arbeit ersichtlich gemacht zu haben glaube, häufiger vorkommt, als dies bisher angenommen wurde.

Man wird also, wenn man aus irgend welchen Organen oder Organtheilen Phenylhydrazin-Verbindungen gewinnt, in der Deutung derselben eine gewisse Vorsicht walten lassen müssen. Handelt es sich um eine Verbindung vom Schmelzpunkt des Pentosazons, so kann man durch die Elementaranalyse entscheiden, ob eine Pentose vorliegt. Bei einer Verbindung jedoch, welche nach allen ihren Eigenschaften als ein Hexosazon anzusprechen wäre, kann auch durch die Analyse keine Entscheidung herbeigeführt werden, und man wird in solchen irgendwie zweifelhaften Fällen stets bemüht sein müssen, die Anwesenheit von Glycuronsäure auszuschliessen, beziehungsweise zu erweisen. Dass die Glycuronsäure unter Umständen sich auch in Organen findet, erscheint a priori durchaus nicht unwahrscheinlich. Hat ja bereits Hammarsten¹⁾ in seiner Publication über das Nucleoproteid des Pankreas die Frage offen gelassen, ob als Spaltungsprodukt derselben sich neben einer Pentose nicht auch Glycuronsäure findet, da das Verhalten seiner Lösungen in mancher Hinsicht für eine solche Annahme sprach.

Zum Nachweis der Glycuronsäure wird man sich mit Erfolg einer Reaction bedienen, welche von keiner Hexose gegeben wird, nämlich der zuerst von Reichl²⁾ aufgefundenen, später von Allen und Tollens³⁾ beschriebenen Orcinprobe, die von Salkowski und Blumenthal⁴⁾ für den Nachweis

1) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, 1894, S. 31.

2) Cyrill Reichl, Ber. d. österr. Gesellsch. z. Förderung d. chem. Ind., Bd. 1, 1879.

3) Allen und Tollens, Annalen der Chemie, Bd. 260, S. 305.

4) Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, 1899 und Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medicin, Bd. 37, 1899.

der Pentosen im Harn eingeführt wurde, und die ich¹⁾ für die Erkennung der Glycuronsäure im Harn empfohlen habe. Das Phenylhydrazin ist, wie aus meinen Untersuchungen hervorgeht, für die Identificirung der Glycuronsäure nicht brauchbar. Einen hierzu geeigneten Körper hat aber in neuester Zeit C. Neuberg²⁾ in dem Bromphenylhydrazin gefunden, welches mit der Glycuronsäure eine wohl charakterisirte Verbindung eingeht. Durch die Darstellung dieser Bromphenylhydrazin-Verbindung wird sich in Zukunft in allen Fällen der sichere Nachweis erbringen lassen, ob Glycuronsäure vorliegt oder nicht.

1) P. Mayer, Berl. klin. Wochenschrift, Bd. 27, 1899.

2) C. Neuberg. Ber. d. chem. Gesellschaft, Bd. 32, H. 13, 1899.

Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure auf Grund der Fällung als Ammonurat.

Von
E. Wörner.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 19. November 1899.)

Die Hopkins'sche Bestimmung der Harnsäure erfreut sich mit Recht allgemeiner Beliebtheit, da sie bedeutend einfacher ist als die Ludwig'sche, ohne ihr an Genauigkeit nachzustehen: mit ihr hat sie aber den Uebelstand gemein, dass die Harnsäure als solche zur Abscheidung gebracht werden muss, um ihre Menge durch Wägung oder Bestimmung des Stickstoffgehaltes ermitteln zu können, was abgesehen von der langen Zeit, welche dadurch eine Bestimmung beansprucht, auch noch deshalb sehr misslich ist, weil die für Waschwasser und Filtrat anzubringende Correctur je nach der Geschicklichkeit des Analytikers verschieden ausfallen wird, wodurch nicht unerhebliche Fehler bedingt werden können.

Hopkins¹⁾ selbst suchte die Abscheidung der Harnsäure als solche dadurch zu umgehen, dass er vorschlug, das Ammonurat mit Kaliumpermanganat zu titriren. Er erhielt hierbei auch befriedigende Ergebnisse. Diese Angabe bestätigten später eine Reihe von Autoren, so Cazé,²⁾ Ritter³⁾ und Folin;⁴⁾ aus deren Arbeiten geht aber auch hervor — Ritter³⁾ spricht es direkt aus —, dass das Erkennen der Endreaction ziemliche Uebung erfordert und dass die Methode besonders dann keine Ersparniss bedeutet, wenn nur wenige Bestimmungen zur Ausführung gelangen, so dass auch jedesmal eine erneute

1) *Proceed. of the Lond. roy. Soc.* 52, 93; 1892.

2) *Sur le dosage de l'acide urique*, These de pharm. Lille 95; *Maly's Jahrb.* 1895, 80.

3) *Diese Zeitschrift*, Bd. XXI, S. 291; 1895.

4) *Diese Zeitschrift*, Bd. XXIV, S. 224; 1897.

Einstellung der Kaliumpermanganatlösung erforderlich wird. Die so wünschenswerthe Vereinfachung wird also nur in bedingtem Maasse erreicht.

Es lag nahe, nach einem Wege zu suchen, der eine direkte Bestimmung des Stickstoffgehaltes des Ammonurats ermöglichte. Da aber wenig Sicherheit für eine gleichmässige Zusammensetzung dieses Niederschlags geboten ist und zum Auswaschen desselben Ammonsulfat gebraucht wird, so musste auf alle Fälle das Ammoniak zuerst entfernt werden. Dies lässt sich nun leicht dadurch bewerkstelligen, dass man das Ammonurat in Natronlauge löst und dann das Ammoniak durch Erwärmen austreibt. Hierbei war allerdings mit der Möglichkeit zu rechnen, dass auch Harnsäurestickstoff verloren geht, da ja bekannt war, dass Harnsäure und verwandte Körper durch Erwärmen mit Alkalien, Baryt und dergleichen aufgespalten werden. Diese Bedenken mussten aber fallen, als durch E. Fischer's¹⁾ Untersuchungen über die Purinkörper festgestellt war, dass diese Spaltbarkeit ausserordentlich verschieden ist, je nach der Acidität der Verbindung, indem die Salzbildung hemmend auf die Verseifung einwirkt. E. Fischer²⁾ hat diese Verhältnisse auch quantitativ verfolgt und gefunden, dass aus der Harnsäure selbst bei 36stündigem Erhitzen mit Normalkalilauge im geschlossenen Rohr nur sehr wenig Ammoniak abgespalten wird, so dass mit Sicherheit zu erwarten war, dass bei dem kurzen Erhitzen, welches nöthig ist, um das Ammoniak des Urates und Ammonsulfates auszutreiben, kein Verlust an Harnsäurestickstoff eintreten würde.

Dahingehende Versuche bestätigten diese Annahme vollständig. Ich glaube, von der Mittheilung der betreffenden Analysenbefunde absehen zu können. Damit war eine wesentliche Vereinfachung der Hopkins'schen Methode gegeben. Man hatte nur nöthig, das Ammonurat mit Ammonsulfatlösung chlorfrei zu waschen, um allen Harn zu entfernen, den Niederschlag in Natronlauge zu lösen, durch Erwärmen das Ammoniak

1) Zusammengefasste Berichte d. d. chem. Ges., Bd. XXXII, 435; 1899.

2) Berichte d. d. chem. Ges., Bd. XXXII, 3266; 1899.

auszutreiben und dann nach Kjeldahl den Stickstoffgehalt der Harnsäure zu ermitteln.

Ehe die so abgeänderte Methode genau beschrieben werden soll, mögen noch einige Bemerkungen über die Fällung der Harnsäure als Urat hier Platz finden.

Während Hopkins ¹⁾ ursprünglich vorgeschrieben hatte, 100 cem. Harn mit 30 g Ammonchlorid zu fällen, hatte Folin ²⁾ später angegeben, dass die verschiedensten Ammonsalze und in erheblich geringeren Mengen eine genau so vollständige Fällung hervorrufen, und hatte empfohlen, die Fällung mit 10%igem Ammonsulfat auszuführen. Bereits nach zwei Stunden sei dann alle Harnsäure als Urat abgeschieden. Er hat nach dieser Methode auch stets gut stimmende Werthe erhalten. Es lag aber bereits eine Mittheilung von A. Edmunds ³⁾ vor, dass Ammonsulfat Harnsäure durchaus nicht so rasch und vollständig ausfällt, eine Beobachtung, die ich nur bestätigen kann. Folin ⁴⁾ geht über Edmunds Angaben mit den Worten hinweg: «Dies Resultat schien mir so wenig im Einklang mit dem, was bei der Natur der Reaction erwartet werden sollte, dass ich glaubte, dasselbe bis auf Weiteres vernachlässigen zu können.»

Wie Folin zu seiner Ansicht gekommen, ist nicht leicht einzusehen, da 10% Ammonsulfat die Harnsäure nur unter besonders günstigen Umständen einmal nach zwei Stunden völlig ausfällen werden. Lässt man derartige Filtrate noch länger stehen, so wird man in allen Fällen eine erneute Abscheidung von Ammonurat feststellen können, während sie sonst mehrere Tage völlig klar bleiben. Um diese Verhältnisse endgültig klar zu stellen, wurde eine Reihe von Harnen mit wechselnden Mengen von Ammonsulfat gefällt; da sich sofort ergab, dass hierbei die Fällung nicht so vollständig ist wie beim Füllen mit Salmiak, so wurden auch Harne bei verschiedener Temperatur gefällt und stehen gelassen, um den Einfluss der letzteren festzustellen.

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

³⁾ The Journal of Physiology 17 (1894—95), pag. 452.

⁴⁾ L. c. pag. 239.

Die Bestimmung der Harnsäure geschah in oben angeführter Weise. Die so erhaltenen Werthe gibt nachstehende Zusammenstellung:

150 ccm. Harn.	Ammon- sulfat in %.	Harnsäure in mg.	Zeit in Stunden.	Tempe- ratur.
I.	10	8,4	2	15
	10	8,8	2	15
II.	10	2,94	2	15
	10	5,46	2	15
	10	71,82	2	37
	10	81,90	2	37
III.	10	78,12	6	15
	10	91,98	12	15
	10	92,82	12	37
	20	86,10	6	15
	20	79,80	6	15
	20	93,66	12	15
	20	89,88	12	37
IV.	10	81,48	24	15
	10	81,90	24	15
	10	74,34	24	37
	10	77,28	24	37
	20	67,60	3	15
	20	57,50	3	15
	20	85,68	24	15
	20	87,78	24	15
V.	30	98,70	1/2	15
	30	97,80	1/2	15
	30	100,8	2	15
	30	99,1	2	15

Es geht aus diesen Bestimmungen mit Sicherheit hervor, dass erst ein Zusatz von 30% Ammonsulfat die Harnsäure rasch und völlig zur Abscheidung bringt. Fällen und Stehenlassen bei höherer Temperatur beschleunigt zwar die Abscheidung, bedingt aber kleine Verluste.

Zugleich glaube ich aber durch diese Versuche auch die Bedenken Cazé's¹⁾ beseitigt zu haben, der bei Verwendung von Ammonsulfat zu hohe Werthe befürchtet, da auch Kreatinin und Xanthinkörper ausgefällt werden sollen. Unter normalen Verhältnissen wird eine Fällung dieser Körper nie zu befürchten sein. Auch die Angaben von Mehu²⁾ über die Fällung von Gallenfarbstoffen durch Ammonsulfat und die Versuche Crismer's,³⁾ der eine ausserordentlich grosse Menge von Körpern durch Ammonsulfat aussalzen konnte, dürfen ohne Weiteres nicht auf diese Verhältnisse übertragen werden.

Von dem Ammoniumchlorid hat das Ammonsulfat dagegen den Vorzug, dass es das Ammonurat als feinkörnigen Niederschlag ausfällt, der sehr leicht zu filtriren und auszuwaschen ist, während Ammoniumchlorid ein gallertiges Urat fällt, dessen Filtration und Auswaschen sehr zeitraubend ist; so gibt Ritter⁴⁾ an, dass er zum Chlorfreiwaschen in einigen Fällen zwei Tage benöthigt habe.

Dieser Uebelstand lässt sich leicht und völlig vermeiden, wenn man den Harn vor dem Fällen auf ungefähr 40—45° erwärmt. Man erhält dann ebenfalls einen krystallinischen Niederschlag, der zweckmässig in der Weise filtrirt wird, dass erst der Niederschlag aufs Filter gebracht wird und dann die Mutterlauge. Man erhält dann sofort ein klares Filtrat, während sonst oft wiederholtes Zurückgiessen nöthig wird.

Ein höheres Erwärmen empfiehlt sich nicht, da hierbei der Niederschlag oft zusammenklebt.

Ich habe die Fällung zum Schluss stets mit 20%o

1) l. c.

2) Journ. de pharm. et de chem., Août 1878. Maly's Jahrb. 8, 269; 1878.

3) Maly's Jahrb. 21, 49; 1892.

4) l. c.

Ammonchlorid vorgenommen; es genügen wohl auch 10%, doch ist man mit 20% absolut sicher, alle Harnsäure zu erhalten.

Um etwas mehr Harnsäure zu bekommen und die Versuchsfehler etwas zu verringern, habe ich es zweckmässig gefunden, 150 ccm. Harn zu einer Bestimmung zu verwenden. Dies hat auch noch den Vortheil, dass bei Uebungsanalysen mit Mischharnen eine einfache Multiplication mit zehn den Werth der Tagesmenge ergibt.

Die Ausführung einer Harnsäurebestimmung gestaltet sich nun folgendermaassen:

150 ccm. Harn werden in einem Becherglase auf 40—45° erwärmt und darin 30 g Chlorammonium aufgelöst. Der Niederschlag von Ammonurat wird nach $\frac{1}{2}$ —1 stündigem Stehen filtrirt und mit 10%iger Ammonsulfatlösung chlorfrei gewaschen: dann wird er auf dem Filter in heisser 1—2%iger Natronlauge gelöst, das Filter mit heissem Wasser nachgewaschen und Filtrat und Waschwasser in einer Porzellanschale¹⁾ auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis alles Ammoniak ausgetrieben ist. Die alkalische Harnsäurelösung wird in einen Kjeldahl-Kolben gespült, mit 15 ccm. concentrirter Schwefelsäure und etwas Kupfersulfat zerstört und das gebildete Ammoniak in bekannter Weise bestimmt.

1 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure entspricht 0,0042 g Harnsäure.

Ich gebe in Nachstehendem die Werthe einer Reihe von Bestimmungen, die auf diese Weise in reinen Harnsäurelösungen und im Harn ausgeführt werden. Zum Vergleich wurde in denselben Proben auch die Harnsäure als solche aus dem Urat abgeschieden und deren Menge durch Bestimmung des Stickstoffgehaltes ermittelt. Die salzsaure Lösung wurde dabei immer möglichst genau auf 10 ccm. eingedampft. Die Harn-

1) Diese Operation kann auch direkt in einem geräumigen Kjeldahl-Kolben ausgeführt werden, doch ist dann fortwährende Beaufsichtigung nöthig, da durch Schäumen leicht Verluste verursacht werden können. Es kann dann in demselben Kolben die ganze Bestimmung zu Ende geführt werden.

säurekrystalle wurden auf einem Filterchen von 3—3½ cm. Durchmesser gesammelt und das Auswaschen so geregelt, dass nie mehr wie 20—30 ccm. Wasser zum Chlorfreiwaschen nöthig waren, so dass den erhaltenen Werthen. 1,5—2 mg Harnsäure zuzufügen waren.

Diese Correctur entspricht aber nicht den thatsächlichen Verhältnissen, da sicher mehr Harnsäure in Lösung bleibt. Folin¹⁾ hat das für reine Harnsäure bereits festgestellt; er fand 1 mg in 12,5 ccm. reinem Wasser; in salzsäurehaltigem Wasser war noch etwas mehr enthalten. Da die unreine Harnsäure, wie sie aus dem Ammonurat aus Harn zur Abscheidung gelangt, naturgemäss noch leichter löslich ist als reine Säure, so müssen dabei die Fehler noch etwas grösser werden. Ich glaube, dass man die nach der neuen Methode erhaltenen höheren Werthe zwanglos dadurch erklären kann. Die geringe Beimengung von Harnfarbstoff ist sicher nur von untergeordneter Bedeutung.

Die Mitfällung anderer Substanzen halte ich bei Verwendung von 20%igem Ammonchlorid als Fällungsmittel unter normalen Verhältnissen für ausgeschlossen. Der Ammonuratniederschlag ist auch mikroskopisch stets gleichmässig.

Bei Vergleichsbestimmungen mit reinen Harnsäurelösungen werden ebenfalls stets einige Milligramme mehr gefunden, wie bei der Abscheidung mit Salzsäure. Es wurde dabei stets der Stickstoffgehalt direkt ermittelt, dann andere Proben mit Ammonchlorid gefällt und die Harnsäure auf verschiedene Weise bestimmt.

Einige so erhaltene Werthe mögen hier folgen:

Es wurden erhalten Harnsäure in Milligrammen durch:

Direkte N-Bestimmung	Mit HCl abgeschieden	Neues Verfahren
99,96	95,58	97,86
84,00	80,46	82,74
49,14	46,94	47,88

1) Diese Zeitschrift Bd. XXIV, S. 230.

Die Werthe im Harn, die ich untenstehend mittheile, bilden das Mittel aus zwei Bestimmungen, die unter sich aber nur Abweichungen von 2—3 mg zeigten.

150 ccm. Harn ergaben Milligramme Harnsäure:

	Mit HCl abgeschieden	Direkte Bestimmung
1	103,9	105,8
2	105,5	107,1
3	62,40	67,20
4	63,06	68,46
5	61,98	65,10
6	78,36	82,11
7	67,40	70,98

Die Harne waren durchweg normal.

Geringe Mengen von Eiweiss sind auf die Bestimmung ohne Einfluss, grössere wirken störend.

Ob in anderen pathologischen Harnen die Methode versagt, muss die Praxis erst ergeben.

Harne mit Urat oder Phosphatsedimenten können ohne Weiteres zur Bestimmung benutzt werden.

Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes.

Von
Dr. V. Arnold.

— —
Mit einer Abbildung.
— —

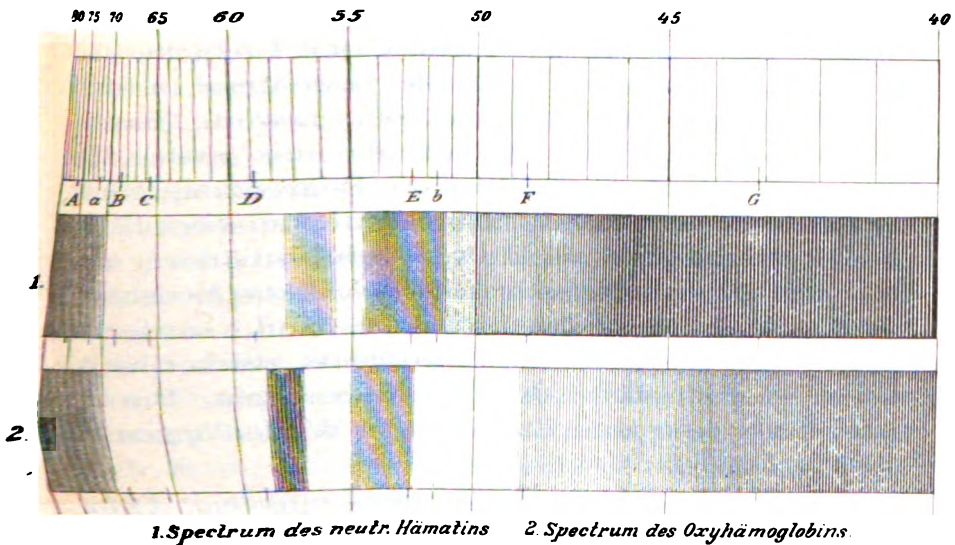
(Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität zu Lemberg.)
(Der Redaction zugegangen am 19. November 1899.)
— —

Das Spectrum des neutralen Hämatins.

Das Hämatin ist nach den Angaben der Autoren (z. B. Neubauer-Vogel, Analyse des Harns 1898: Olof Hammarsten, Lehrbuch der physiolog. Chemie 1899 u. A.) unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether und Chloroform. Bezüglich des spectralen Verhaltens desselben sind die Spectren des alkalischen Hämatins, des Hämatins in saurer Lösung und des reducirten Hämatins beschrieben worden. Ein Zwischenprodukt zwischen Hämatin und Hämochromogen haben 1890 Bertins-Sans und Moitessier beschrieben. Dasselbe ist durch ein auf D liegendes Absorptionsband charakterisirt. Ein neutrales Hämatinspectrum war bisher unbekannt.

Nun beobachtete ich, als ich eine alkoholische, stark mit Kalilauge versetzte Hämatinlösung neutralisirte, dass im Moment des Eintritts der neutralen Reaction die braune Farbe der Lösung in Roth umgeändert wurde, zugleich aber fiel mir auf, dass das Hämatin nur theilweise ausgefällt wurde, zum grossen Theil aber in (neutraler, alkoholischer) Lösung blieb. Erst durch stärkere Verdünnung mit destillirtem Wasser wurde das Hämatin ausgefällt. (Die alkalische Hämatinlösung erhielt ich auf diese Weise, dass ich frisches, defibrinirtes Blut in stark mit KOH versetzten Alkohol eintrug, worauf zum Sieden erhitzt und durch Glaswolle filtrirt wurde.)

Dass das Hämatin — entgegen der Eingangs erwähnten Ansicht von der Unlöslichkeit des Hämatins in Alkohol, hier in Lösung verblieb, musste ich auf den Umstand beziehen, dass die Lösung bei dem von mir gewählten Verfahren reich an Neutralsalz war und dass dieser Gehalt an Neutralsalz die Löslichkeit des Hämatins in Alkohol bedingte. Das ausgeschiedene, auf dem Filter gut ausgewaschene und getrocknete Hämatin erwies sich nämlich unlöslich in Wasser, in concentrirten wässerigen Lösungen von Neutralsalzen (Ammonsulfat, NaCl), in reinem absoluten und verdünnten Alkohol:



wurde es jedoch mit einer alkoholischen Lösung eines Neutralsalzes (ich verwendete NaCl und Ammonsulfat) erwärmt, so löste es sich mit ziemlicher Leichtigkeit. Die erhaltene neutrale Hämatinlösung wurde nun auf ihre spektroskopischen und sonstigen Eigenschaften hin untersucht. Eine solche Lösung ist deutlich roth gefärbt. Sie besitzt bei geeigneter Verdünnung ein charakteristisches, aus zwei Bändern bestehendes Absorptionsspektrum, welches zwischen den Fraunhofer'schen Linien D und b eingeschlossen ist (Fig. 1).

Diese Bänder sind jedoch im Vergleich zu dem Spectrum des Oxyhämoglobins deutlich gegen das violette Ende des Spectrums verschoben, so dass das erste Band von der D-Linie durch einen entsprechend breiten Zwischenraum getrennt ist. Auch das zweite Hämatinband ist im Vergleich zum entsprechenden Oxyhämoglobinband gegen das violette Ende verschoben: es reicht übrigens mit seinem rechten Rande ein wenig über die b-Linie hinaus, während das zweite Oxyhämoglobinband diese Linie nicht erreicht, indem es etwa mit E abschliesst. Ausserdem verhalten sich die beiden Bänder bezüglich ihres Intensitätsverhältnisses zu einander gerade entgegengesetzt, wie die beiden Oxyhämoglobinbänder: während das erste Oxyhämoglobinband an Intensität der Lichtabsorption und Schärfe der Begrenzung das zweite bedeutend übertrifft (Fig. 2), ist hier gerade entgegengesetzt das zweite Hämatinband intensiver und schärfer begrenzt als das erste. Was übrigens die Schärfe und Deutlichkeit der Begrenzung betrifft, so sind die für das neutrale Hämatin charakteristischen Bänder weniger scharf begrenzt als die Oxyhämoglobinbänder, wozu noch der Umstand beiträgt, dass die beiden Absorptionsbänder durch einen schwachen Schatten verbunden sind, sowie dass die Absorption des violetten Endes des Spectrums stärker hervortritt als bei gleich gefärbten Oxyhämoglobininösungen. Die Lage beider Bänder des neutralen Hämatins ist, in Wellenlängen ausgedrückt, folgende:

·Zur Gewinnung dieser Zahlen diente mir ein Abbe-Zeiss'sches Mikrospektroskop.

Band 1. λ 575—556.

Band 2. λ 546—516.

Behufs exacter Feststellung des Ortes beider Absorptionsbänder wurde das Spectrum des neutralen Hämatins noch vermittelst eines grossen Spectroskops von Krüss (bei Verwendung von 2 Prismen) untersucht. Die vermittelst dieses Instrumentes gewonnenen Zahlen wichen übrigens kaum von den mitgetheilten ab:

Band 1. λ 576—555.

Band 2. λ 545—518.

Des Vergleiches halber wurde mit demselben Instrumente auch eine Oxyhämoglobinlösung untersucht:

Band 1. λ 582—571.

Band 2. λ 550—526.

Die wichtigste Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung ist jedenfalls die, dass die rothe Lösung beim Erhitzen ihre Farbe in Braun ändert, während gleichzeitig an Stelle des charakteristischen neutralen Spectrums das Absorptionsband des alkalischen Hämatins tritt; beim Abkühlen der Lösung restituiert sich zugleich mit der ursprünglichen rothen Färbung auch das neutrale Spectrum. Dies ist für die Charakterisirung einer neutralen Hämatinlösung um so wichtiger, als nicht nur das Spectrum derselben dem Oxyhämoglobinspectrum ähnlich ist, sondern auch die Farbe der Lösung lebhaft an Oxyhämoglobin erinnert, derart, dass eine stärker verdünnte neutrale Hämatinlösung von einer verdünnten Oxyhämoglobinlösung nur schwer ohne Spectroskop zu unterscheiden ist, da beide denselben rüthlichgelben Farbenton besitzen. Beim Erhitzen würde sich eine Oxyhämoglobinlösung trüben, während eine klare Hämatinlösung selbstverständlich auch beim Erhitzen klar bleibt. Was übrigens die Färbung einer neutralen Hämatinlösung betrifft, so tritt diese Schwierigkeit der Unterscheidung derselben von einer Oxyhämoglobinlösung hauptsächlich bei stärkerer Verdünnung hervor. Concentrirtere Lösungen unterscheiden sich doch darin, dass eine Oxyhämoglobinlösung lebhafter roth erscheint, während das Roth der neutralen Hämatinlösung jedenfalls stumpfer und matter ist, sowie einen Stich ins Gelbe zeigt. (Dies tritt besonders im auffallenden Licht deutlich hervor.) Verdünnt man eine neutrale Hämatinlösung sowie eine Oxyhämoglobinlösung derart, dass ihre Farbenintensität dem Auge gleich erscheint, so bemerkt man, dass bei einer Verdünnung, bei welcher das Spectrum des neutralen Hämatins schon verschwindet, die beiden Bänder des Oxyhämoglobins noch sehr scharf hervortreten, sowie bei weiterer Verdünnung noch ziemlich lange sichtbar bleiben. Ausgefälltes neutrales Hämatin erscheint, wenn man dasselbe zwischen zwei Glasplatten zu einer durchsichtigen Schicht

durch starken Druck ausbreitet, roth mit leicht gelblichem Farbenton.

Was die weiteren Eigenschaften einer neutralen Hämatinlösung betrifft, so ist für diese noch charakteristisch, dass eine klare Lösung, die also eine zur Auflösung des Hämatins genügende Menge Neutralsalz enthält, durch Verdünnen mit destillirtem Wasser oder reinem Alkohol sich trübt und ihr Hämatin in Form von fleischfarbenen Flöckchen ausfallen lässt. Eine solche, eine ungenügende Menge Neutralsalz enthaltende Lösung wird sich beim Erwärmen klären, indem sich das ausgefällte Hämatin im Alkohol löst, beim Abkühlen der Lösung aber wird wieder ein Theil des Hämatins ausgefällt werden.

Setzt man einer neutralen Hämatinlösung auch nur die geringste Menge Kalilauge zu, so wird die Lösung braun und es erscheint das Spectrum des alkalischen Hämatins. Gegen den Zusatz von Säure ist dagegen die Lösung um ein Bedeutendes weniger empfindlich und sie verändert sich dementsprechend nur langsam. Zuerst bemerkt man, dass das erste Hämatinband verwaschen auszusehen beginnt; bei weiterem Säurezusatz verschwindet dann dasselbe, worauf auch das zweite Band an Intensität und Schärfe der Begrenzung verliert und etwas nach vorn rückt. Gleichzeitig damit tritt das Band zwischen C und D auf. Die Lösung hat mittlerweile ihre rothe Färbung eingebüsst und ist braun geworden.

Ich habe mir nun die Frage vorgelegt, unter welchen Umständen das neutrale Hämatin aus dem Blutfarbstoff entsteht, und habe gefunden, dass überall dort, wo der Blutfarbstoff in neutraler Lösung in seine Componenten zerfällt, der Farbstoff als neutrales Hämatin abgespalten wird.

Am leichtesten bewirkt man diese Umwandlung in neutrales Hämatin bei Verwendung von Methämoglobin, was darauf hinweist, dass das Methämoglobin ein viel lockereres Molekulargefüge besitzt, als das Oxyhämoglobin. Ich habe mit Methämoglobinlösungen folgende Versuche vorgenommen: Wird eine Methämoglobinlösung mit demselben Volumen concentrirten Alkohols versetzt, so ändert sich augenblicklich die Färbung der braunen Lösung in ein helles Roth; das Spectrum des

Methämoglobins verschwindet; die Lösung trübt sich sogleich und lässt nach kurzer Zeit neutrales Hämatin ausfallen. Den ganzen Vorgang kann man mit dem Spectroskop verfolgen, wenn man entweder die Methämoglobinlösung oder den Alkohol mit einer genügenden Menge einer concentrirten Neutralsalzlösung versetzt, da in diesem Falle die Trübung der Lösung und die Ausfällung des Hämatins ausbleiben und die Lösung bequem spectroscopisch untersucht werden kann. Man bemerkt in diesem Fall, dass gleichzeitig mit dem Umschlag der braunen Färbung in Roth das Methämoglobinspectrum verschwindet; an Stelle desselben treten fast augenblicklich die beiden Bänder des neutralen Hämatins auf. Dass wir es hier in der That mit neutralem Hämatin zu thun haben, dies wird ausser der Lage und den sonstigen Eigenschaften dieses Spectrums noch durch das Verhalten der Lösung beim Erhitzen derselben bewiesen (Auftreten des Bandes vor D; Restituierung des neutralen Hämatinspectrums beim Abkühlen der Lösung. Zugleich bemerken wir den schon oben erwähnten Farbenwechsel: Die erhitzte Lösung wird braun, beim Abkühlen erscheint jedoch zugleich mit dem neutralen Spectrum auch die rothe Färbung. Die Lösung trübt sich beim Erhitzen nicht, was bei einer Oxyhämoglobininlösung der Fall sein müsste. Die ausgefällten fleischrothen Flöckchen sind in Wasser, auch beim Erwärmen, vollkommen unlöslich, lösen sich aber in alkoholischer Lösung eines Neutralsalzes). Ueberhaupt gestattet uns das geschilderte Verhalten einer Methämoglobinlösung auf die bequemste Weise, eine neutrale Hämatinlösung zu erhalten; um das Spectrum und die sonstigen Eigenschaften einer solchen Lösung zu untersuchen. (Uebrigens wird durch Alkohol auch eine Oxyhämoglobininlösung in derselben Weise verändert, wie eine Methämoglobinlösung, das ist, es wird neutrales Hämatin abgespalten.)

Im Gegensatz zum Oxyhämoglobin wird aber das Methämoglobin auch durch viel unbedeutendere Eingriffe in derselben Richtung verändert. So genügt mehrmaliges Schütteln mit Chloroform, um die braune Färbung einer Methämoglobinlösung in Hellroth unzuwandeln und den Farbstoff als neutrales Hämatin

auszufällen. Fügt man jetzt etwa $\frac{1}{3}$ Volumen Alkohol hinzu, so wird — nachdem man die Eprouvette einmal umgewendet hat — das ausgefällte Hämatin durch das anhaftende Chloroform in Gestalt eines schön rothen Niederschlages zu Boden gerissen. Man kann dieses sehr charakteristische Verhalten einer Methämoglobinlösung recht gut — wie ich an anderer Stelle ausführlicher mittheilen will — zum qualitativen Nachweis desselben, z. B. im Harn, benutzen. Dieser rothe Niederschlag besitzt die Eigenschaften ausgefällten neutralen Hamatins: Rothe Farbe, vollständige Unlöslichkeit in kaltem oder auf 35° C. erwärmtem destillirten Wasser, charakteristisches Spectrum des neutralen Hämatins u. s. w. Im Gegensatz zum Methämoglobin zeigt eine mit Chloroform geschüttelte Oxyhämoglobinlösung in derselben Zeit (ja sogar nach 24 Stunden) keine sichtbare Veränderung.

Auch Aether bewirkt in einer Methämoglobinlösung dieselbe Abspaltung des neutralen Hämatins, wiewohl diese Einwirkung hier nicht so energisch verläuft, so dass noch nach 24 Stunden neben ausgeschiedenem Hämatin gelöstes Methämoglobin nachweisbar ist. Eine Oxyhämoglobinlösung wird in derselben Zeit durch Aether nicht sichtbar verändert. Dass es sich in beiden Fällen um neutrales Hämatin handelte, dies konnte ich, abgesehen davon, dass diese Niederschläge dieselbe Färbung und dieselben Löslichkeitsverhältnisse besaßen, wie das aus Hämatinalkali gewonnene neutrale Hämatin, durch spectroscopische Untersuchung desselben feststellen. Zu diesem Zwecke wurde der ausgewaschene Niederschlag noch etwas feucht zwischen zwei Glasplatten einem starken Drucke ausgesetzt, so dass er sich zu einer durchsichtigen Schicht ausbreitete, die bequem spectroscopisch untersucht werden konnte. Es konnten auf diese Weise diese Niederschläge in ihrem ursprünglichen unveränderten Zustande untersucht werden. Sie boten alle das Spectrum des neutralen Hämatins.

Das Resumé dieser Studie lässt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Eine neutrale Hämatinlösung ist von rother Farbe, mit einem Stich ins Gelbe; stark verdünnte Lösungen

sind gelblichroth, wie stark verdünnte Oxyhämoglobininlösungen.

2. Man erlangt eine solche neutrale Hämatinlösung am bequemsten, wenn man eine Methämoglobinlösung mit genügender Quantität Neutralsalz versetzt (NaCl) und dann $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol zusetzt; das Neutralsalz verhindert die Ausfällung des Hämatins und hält dasselbe in Lösung. Durch Neutralisiren einer alkoholischen, mit Kalilauge versetzten Hämatinlösung gelangt man zu demselben Ergebniss.
3. Eine solche neutrale Hämatinlösung besitzt ein charakteristisches, aus zwei Bändern bestehendes Absorptionsspectrum, welches zwischen den Frauenhofer'schen Linien D und b eingeschlossen ist; das zweite Band ist intensiver und besser begrenzt als das erste.
4. Die charakteristische Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung ist der Umschlag der rothen Farbe in Braun beim Erhitzen; gleichzeitig verschwindet das Spectrum des neutralen Hämatins, um dem Absorptionsband des alkalischen Hämatins Platz zu machen. Beim Abkühlen der Lösung restituirt sich zugleich mit der ursprünglichen rothen Farbe der Lösung auch das ursprüngliche neutrale Spectrum. Eine weitere Eigenschaft einer neutralen Hämatinlösung wäre die Trübung beim Verdünnen derselben mit destillirtem Wasser, da zur Auflösung des Hämatins ein gewisser Gehalt an Neutralsalz Erforderniss ist. Diese beiden Eigenschaften charakterisiren eine neutrale Hämatinlösung hinlänglich einer Oxyhämoglobininlösung gegenüber.

Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Niemilowicz am Schlusse dieser Abhandlung für die mir gewährte Unterstützung meinen lebhaften Dank abzustatten.

Lemberg, am 12. November 1899.

Ueber Oxydation von krystallisirtem Eiereiweiss mit Wasserstoffsuperoxyd.

Von

Fr. N. Schulz. *)

(Aus dem physiologischen Institut zu Jena. [Chemische Abtheilung.])

(Der Redaction zugegangen am 28. November 1899.)

I. Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat.

Die Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat ist vielfach Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Die letzte Arbeit hierüber, von Bernert,¹⁾ hat uns gezeigt, dass bei dieser Oxydation ganz analoge Vorgänge sich abspielen, wie bei der Bildung von Albumosen und Peptonen durch Einwirkung der verdauenden Fermente auf Eiweiss. Das zunächst entstehende Produkt, der Maly'schen Oxyprotosulfonsäure entsprechend, erleidet im weiteren Verlaufe Veränderungen, die man, in Uebereinstimmung mit der Bildungsweise der gewöhnlichen Verdauungsprodukte, als hydrolytische Spaltungen aufzufassen berechtigt ist. Dieselben verdanken ihren Ursprung der bei der Oxydation aus dem Kaliumpermanganat sich bildenden Kalilauge, welche auch unter anderen Bedingungen peptonisirend wirkt; dieselbe ist also auch diesmal für die Entstehung der albumose- und peptonartigen Spaltungsprodukte der Oxyprotosulfonsäure verantwortlich zu machen, zumal sie hierbei in statu nascendi zur Wirkung gelangt.

*) Die Untersuchung habe ich in Gemeinschaft mit Herrn Apotheker Heinrich Couvreur ausgeführt.

1) R. Bernert, Ueber Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat. Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 272—307. Dortselbst ist die einschlägige Litteratur ersichtlich.

Aber nicht allein diese Nebenwirkung des Kaliumpermanganates kommt bei der Beurtheilung der Oxyprotosulfonsäure und ihrer Umwandlungsprodukte in Betracht, sondern es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass die entstehende Kalilauge auch anderweitige Abspaltungen hervorruft. So glaubt auch Bernert der Anschauung Maly's und anderer Forscher, wonach die Oxyprotosulfonsäure ein reines Oxydationsprodukt ist, entgegenzutreten zu müssen.

Wegen dieser störenden Nebenwirkungen des Kaliumpermanganates haben wir die Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Eiweiss einer Untersuchung unterworfen, in der Hoffnung, zu reinen Oxydationsprodukten gelangen zu können.

II. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Als Ausgangsmaterial benutzten wir bei unseren Versuchen, abgesehen von einigen Vorversuchen, krystallisirtes Eiereiweiss. Dasselbe wurde dargestellt nach dem von Krieger¹⁾ angegebenen Verfahren: Eiereiweiss wurde mit dem gleichen Volumen concentrirter Ammonsulfatlösung versetzt, filtrirt, zu dem Filtrat wurde verdünnte Schwefelsäure (ca. $\frac{1}{10}$ normal) bis zur starken Trübung hinzugegeben. Der Krystallbrei, der sich nach einiger Zeit in reichlicher Menge abschied, wurde abfiltrirt und in der üblichen Weise mehrmals umkrystallisirt. Beim Umkrystallisiren unterblieb der Schwefelsäurezusatz; die filtrirte Lösung des Krystallbreis wurde einfach mit concentrirter Ammonsulfatlösung bis zur beginnenden Ausscheidung versetzt. Auch wir geben nach unseren Erfahrungen der von Krieger empfohlenen Schwefelsäure gegenüber der Essigsäure, welche Hopkins und Pinkus²⁾ zu einem analogen Darstellungsverfahren benutzten, den Vorzug.

Zur weiteren Verarbeitung wurde der abfiltrirte Krystallbrei in Wasser gelöst, das anhaftende Ammonsulfat durch

1) Hans Th. Krieger, Ueber Darstellung krystallinischer thierischer Eiweissstoffe. Inaug. Diss., Strassburg. 1899.

2) Observations on the crystallisation of Animal Proteids. Journ. of Physiology, XXIII, p. 132; 1898.

Dialyse nach Möglichkeit entfernt. Die so erhaltene Lösung wurde direkt zur Oxydation benutzt.

In einem aliquoten Theil wurde durch Fällung mit Alkohol und Erhitzen das Eiweiss zur quantitativen Bestimmung gefällt. Das so erhaltene Eiweisspräparat wurde, nachdem es mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen und bei 105° getrocknet war, der Elementaranalyse unterworfen. Es war dies nothwendig, da weder Krieger noch Hopkins und Pinkus ihr krystallisirtes Eiweiss analysirt hatten.

Das von uns analysirte Präparat hatte (aschefrei berechnet) die Zusammensetzung:

C 52,26, H 7,4, N 15,19, S 1,23, O 23,92 %¹⁾

Der Aschegehalt betrug 0,2 %.

Das nach dem alten Hofmeister'schen Verfahren gewonnene Eiweiss enthält:

C 53,28, H 7,26, N 15,00, S 1,18, O 23,28 %²⁾

Es findet sich also eine nennenswerthe Differenz im Kohlenstoffgehalt.

Es wurde daher ein zweites Präparat nach dem Säureverfahren hergestellt; dasselbe war viermal umkrystallisirt und im Uebrigen in derselben Weise behandelt, wie vorher beschrieben. Dies Präparat wies denselben C- und H-Gehalt auf,

¹⁾ Aschebestimmung:

0,2993 g Substanz lieferten 0,0007 g Asche = 0,2 %.

C- und H-Bestimmungen:

0,2253 g Substanz lieferten 0,4321 g CO₂ = 52,41 % C (aschefrei),

0,1400 g H₂O = 7,00 % H,

0,3870 g „ „ 0,7381 g CO₂ = 52,12 % C,

0,2722 g H₂O = 7,81 % H.

N-Bestimmungen (Kjeldahl):

0,2491 g Substanz lieferten 0,03794 g N = 15,27 %,

0,1920 g „ „ 0,02866 g N = 14,96 %,

0,1975 g „ „ 0,02935 g N = 14,89 %,

0,2218 g „ „ 0,03462 g N = 15,63 %.

S-Bestimmung (mit Soda-Salpeter nach Hammarsten):

0,7918 g Substanz lieferten 0,0741 g BaSO₄ = 1,29 % S,

0,6490 g „ „ 0,0558 g BaSO₄ = 1,18 % S.

²⁾ Diese Zeitschrift Bd. XXIV. S. 169.

wie das zuerst analysirte; es enthielt **C 52,22, H 7,44.**¹⁾ Also auch hier findet sich dieselbe Differenz gegenüber dem Hofmeister'schen Eieralbumin. Da gleichzeitig der Wasserstoffgehalt etwas erhöht ist, so kann man an die Möglichkeit denken, dass bei dem Säureverfahren ein Hydrat des Hofmeister'schen Eieralbumins krystallisirt.

Die Menge des durch Alkali als Schwefelwasserstoff abspaltbaren Schwefels wurde nach der Zinkmethode²⁾ bestimmt; es liessen sich 0,5 % Schwefel abspalten, also circa die Hälfte des Gesamtschwefels.³⁾ Aus dem Hofmeister'schen Eieralbumin liessen sich nach der Analyse von Schulz 0,49 % Schwefel durch Alkali abspalten.⁴⁾ Auch dieser Umstand zeigt, dass die beiden krystallisirten Albumine im Wesentlichen identisch sind.

Diese Zahlen sind für die vorliegende Untersuchung von besonderem Interesse, da nach der Annahme von Maly der Hauptvorgang bei der Bildung der Oxyprotosulfonsäure in der Oxydation gerade dieses abspaltbaren Schwefels besteht, ein Umstand, dem die Oxyprotosulfonsäure ja ihren Namen verdankt.

III. Litteratur über Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Eiweiss.

Ueber die Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Eiweiss liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor, die noch

1) Aschebestimmung:

0,54 g Substanz = 0,0021 g Asche = 0,4 %.

C- und H-Bestimmung:

0,2809 g Substanz lieferten 0,5369 g CO₂ = 52,34 % C (aschefrei),

0,1786 g H₂O = 7,31 % H,

0,2945 g „ „ 0,5604 g CO₂ = 52,10 % C,

0,2000 g H₂O = 7,57 % H.

2) Fr. N. Schulz, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss. Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 16—35; 1898.

3) 0,5213 g Substanz lieferten 0,019 g BaSO₄ = 0,00261 g S = 0,50 %,

1,011 g „ „ 0,037 g BaSO₄ = 0,00508 g S = 0,50 %.

4) l. c.

dazu in den neueren Lehrbüchern keine Beachtung gefunden haben.

Der Einfluss des Wasserstoffsuperoxyds auf Fäulniss und Gährungsvorgänge ist vielfach untersucht worden; ebenso ist über die Fähigkeit des Fibrins, sowie vieler Gewebsstoffe, H_2O_2 in H_2O und O zu zerlegen, eine umfangreiche Litteratur vorhanden. Ob und in welcher Weise die hierbei beteiligten Eiweisskörper durch das Wasserstoffsuperoxyd chemisch verändert werden, darüber finden sich jedoch nur wenige gelegentliche Bemerkungen. So glaubte Thénard,¹⁾ dass das Fibrin bei der Zerlegung des Wasserstoffsuperoxyds nicht verändert wurde. Demgegenüber wies Béchamp²⁾ nach, dass 30 g Fibrin, welche mit H_2O_2 bis zur Erschöpfung ihrer Wirksamkeit in Berührung blieben, 0,16 g organische Substanz an die Flüssigkeit abgaben.

Die ersten etwas specielleren Angaben über den fraglichen Gegenstand rühren von Bert u. Regnard her.³⁾ Dieselben beobachteten, dass sowohl aus gelösten als ungelösten Albuminstoffen durch neutrale oder schwach mit Schwefelsäure angesäuerte Lösungen von Wasserstoffsuperoxyd diffusibele Substanzen gebildet werden, welche die Eigenschaft von Pepton haben, übrigens durch Gerbsäure nicht gefällt werden; in anderen Fällen finden sich Körper mit den Reactionen der gewöhnlichen Peptone neben durch Salpetersäure fällbaren Uebergangsprodukten.

Späterhin hat Chandelon⁴⁾ die durch diese Untersuchungen angeregte Frage wieder aufgenommen.

Die gewagten und unhaltbaren theoretischen Betrachtungen, die Chandelon aus seinen Beobachtungen über die Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf Eiweiss über die Peptonisation im Allgemeinen und speciell über die Wirkungsweise des Pepsins gezogen hat,⁵⁾ haben im Verein mit der ungünstigen Kritik, welche Maly aus anderen Gründen an der Arbeit Chandelon's geübt hat,⁶⁾ diese Untersuchungen anscheinend in Misscredit gebracht; wenigstens haben die Versuche in den neueren

1) Thénard, s. Maly's Jahresbericht Bd. 12, S. 58; 1882.

2) Maly's Jahresbericht Bd. XII, S. 58.

3) T. Bert u. P. Regnard, Comptes rendues 1883, S. 133—135.

4) Chandelon, Beitrag z. Studium der Peptonisation. Chem. Ber. Bd. XVII, 2143—2151. 1884.

5) Chandelon, Beitrag z. Studium der Peptonisation. Chem. Ber. Bd. XVIII, 1999—2011. 1885.

6) Maly's Jahresbericht für Tierchemie Bd. XV, S. 244. 1885.

Lehrbüchern keinen Platz gefunden. Nichtsdestoweniger bieten die tatsächlichen Beobachtungen manches Beachtenswerthe.

Chandelon verwandte nicht fertiges H_2O_2 , sondern er liess dasselbe in nascirendem Zustand einwirken, indem er in der Eiweisslösung Baryumsuperoxyd fein vertheilte, aus welchem er durch einen CO_2 -Strom das Wasserstoffsuperoxyd frei machte. Er erhielt hierbei im Wesentlichen 3 verschiedene auf das Eiweiss zurückzuführende Körper: 1. Eine Proteinsubstanz (Albuminat), welche in ihren Eigenschaften sich sehr dem Casein näherte. 2. Eine albumoseartige Substanz. 3. Einen Körper mit allen Reactionen der Peptone. Das «caseinähnliche Protein» ist in seinen Löslichkeitsverhältnissen, sowie in seinem Verhalten gegenüber den gewöhnlichen Eiweissfällungsmitteln mit der kurze Zeit später (1885) von Maly beschriebenen Oxyprotsulfonsäure im Wesentlichen identisch. Ob dasselbe im Gegensatz zur Oxyprotsulfonsäure die Millon'sche Reaction gibt oder nicht, ist nicht angegeben, aber wahrscheinlich, da das gleichzeitig entstandene «Propepton» und «Pepton» diese Reaction gibt.

Die Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds gestaltete sich also bei der gegebenen Versuchsanordnung im Wesentlichen analog der des Kaliumpermanganats, wie sie die spätere Untersuchung von Bernert klar gelegt hat. Eine genaue Charakterisirung der gebildeten Stoffe fehlt, so dass wir keine Anhaltspunkte dafür haben, ob wir es hier mit einem Spaltungsvorgang oder einer Combination von Oxydation und Spaltung zu thun haben. Chandelon selbst fasst die Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds als reine Spaltung, analog der Bildung der Verdauungsprodukte durch das Pepsin, auf.

Diese Befunde Chandelon's wurden im Wesentlichen bestätigt und durch Einzelnes erweitert von Wurster.¹⁾ Wurster versetzte das nicht filtrirte Weisse des Eies mit dem gleichen Volumen H_2O_2 (käufliches?), schüttelte gut durch,

1) C. Wurster. Ueber das Verhalten von Wasserstoffsuperoxyd gegen Eiweiss. Chem. Ber. Bd. XX, 263—267. 1887.

Derselbe. Ueber die Einwirkung oxydirender Agentien auf Hühner-eiweiss. Chem. Ber. Bd. XX, 1030—1033.

setzte dann auf 100 ccm. Eiweiss 1—2 ccm. käufliche Milchsäure und 1—2 g Kochsalz hinzu. Bei Bruttemperatur schied sich bald eine feste, geronnene, käseähnliche Masse aus, die identisch ist mit dem von Chandelon beschriebenen «caseinähnlichen Protein». Die Mutterlauge enthält eine geringe Menge mit Alkohol fällbaren Peptons, jedoch nur so wenig, «dass die Fällung des Hühnereiweisses beinahe als eine quantitative betrachtet werden darf». Diese Angabe steht im Widerspruch mit der Chandelon's, der grosse Mengen Pepton, unter Umständen sogar fast ausschliesslich Pepton, erhält. Wurster glaubt dies dadurch erklären zu können, dass nach der Versuchsanordnung Chandelon's (s. vorher) das H_2O_2 durch die CO_2 zersetzt worden sei; Chandelon habe also gar nicht die Einwirkung von H_2O_2 untersucht, sondern nur die des sich zersetzenden H_2O_2 . Wir müssen noch weiterhin auf diesen Punkt zurückkommen.

Ueber die caseinähnliche Substanz macht Wurster die Bemerkung, dass der gefällte Eiweisskörper eine alkalische Bleilösung schwärzt und sich nicht in essigsauerm oder weinsauerm Natron löst, also nicht die Oxyprotsulfonsäure Maly's und Brücke's ist. Ob dieser Körper die Millon'sche Reaction gibt, darüber liegt auch hier keine Angabe vor.

Des Weiteren theilt Wurster Versuche mit, quantitativ zu bestimmen, ob und wie viel Sauerstoff von dem Wasserstoff-superoxyd an die Eiweisslösung abgegeben wird. Es zeigte sich immer eine, wenn auch geringe Aufnahme von Sauerstoff durch das Eiweiss.

Wurde das von Wurster Eicasein genannte Produkt bei Gegenwart von H_2O_2 einer künstlichen Verdauung durch Pepsinsalzsäure unterworfen, so verlief die Spaltung des Peptons ohne weitere Sauerstoffaufnahme.

Auch diese Angaben Wurster's haben in die neueren Lehrbücher keine Aufnahme gefunden; aus diesem Grunde auch dies etwas ausführliche Citat.

Bei der Unvollständigkeit der vorliegenden Beobachtungen und dem erhöhten Interesse, welches dieselben durch die Untersuchungen Bernert's über die Oxydation mit Kaliumpermanganat

gewonnen haben, hielten wir es für lohnend, diesen Gegenstand etwas eingehender zu untersuchen. Hierbei waren es zunächst zwei Gesichtspunkte, welche uns hauptsächlich interessierten. Erstens: in welcher Beziehung zu dem Ausgangsmaterial einerseits und der Oxyprotosulfonsäure andererseits steht der erhaltene caseinähnliche Körper, den wir vorgehend Oxyprotein nennen möchten? Zweitens: ist die beobachtete Bildung von Pepton eine reine Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds, oder ist sie als Nebenwirkung aufzufassen?

IV. Beziehung des Oxyproteins zum Protein und zur Oxyprotosulfonsäure.

Zur Oxydation der oben beschriebenen Lösung von kristallisiertem Eiereiweiss wurde von Merck bezogenes Wasserstoffsuperoxyd verwandt. Dasselbe reagierte gegen Lackumpapier und gegen Cochenille sauer; 25 cem. brauchten zur Neutralisation 2 cem. $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge (Indicator Cochenille). Da ganz reines H_2O_2 sauer reagiert¹⁾ und überdies die Acidität, wenn durch eine verunreinigende Säure bedingt, nur eine minimale war,²⁾ so glaubten wir vorderhand von einer weiteren Reinigung des Wasserstoffsuperoxyds absehen zu können. Verwendet man durch Destillation (nach Wolffenstein) gereinigtes Wasserstoffsuperoxyd (25 cem. brauchten für Neutralisation 0,3 cem. $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge), so erfolgt die Abscheidung des Oxyproteins so viel langsamer, trotz Anwendung von Brüttemperatur und Platinmohr, dass wir auch aus diesem Grunde für die Darstellung des Oxyproteins uns vorläufig auf die Verwendung des nicht destillierten Wasserstoffsuperoxyds beschränkten. (Näheres in Abschnitt V).

Versetzt man eine Eiweisslösung mit käuflicher Wasserstoffsuperoxydlösung und erhitzt zum Sieden, so coaguliert das Eiweiss. Lässt man eine Eiweisslösung mit diesem Wasser-

1) R. Wolffenstein, Concentration und Destillation von H_2O_2 . Chem. Ber. Bd. XXVII, 3307—3312. 1894.

2) Hierbei ist zu berücksichtigen, dass durch Zusatz zu der wässerigen Eiweisslösung eine weitere Verdünnung eventuell vorhandener Säure statt hat.

stoffsuperoxyd bei Zimmertemperatur stehen, so tritt bald eine Opalescenz und milchige Trübung ein, es dauert jedoch mehrere Wochen, bis sich ein Niederschlag absetzt. Bei genügend langem Stehen wird auch unter diesen Bedingungen die Ausscheidung eine vollständige, was sich daraus ergibt, dass dann eine abfiltrirte Probe beim Sieden nicht mehr gerinnt.

Bei Bruttemperatur erfolgt diese Ausscheidung wesentlich rascher und ist durchschnittlich innerhalb 8 Tagen vollendet. Setzt man zu einer mit Wasserstoffsuperoxyd beschickten Eiweisslösung Platinmohr, so erfolgt unter langsamer, sichtbarer Sauerstoffentwicklung auch bei Zimmertemperatur die Ausscheidung des Oxyproteins ziemlich rasch und ist ebenfalls in ca. 8 Tagen beendet. Wendet man Platinmohr und Bruttemperatur an, so dauert die vollständige Ausscheidung nur 2—3 Tage. Bei unseren Hauptdarstellungen des Oxyproteins wandten wir diese letzteren Versuchsbedingungen an. Wir verwandten einen grossen Ueberschuss von Wasserstoffsuperoxyd und setzten die eine Hälfte erst am zweiten Tage hinzu. Von der Vollständigkeit der Ausfällung überzeugten wir uns durch den negativen Ausfall der Kochprobe.¹⁾ Gegen Schluss der Oxydation ist es zweckmässig, zu der Kochprobe etwas Kochsalzlösung hinzuzugeben, da dann die Coagulation leichter erfolgt. Die ausgeschiedenen Massen werden abfiltrirt, gewaschen; mit Wasser, dem eine Spur Natronlauge hinzugesetzt war ($\frac{1}{100}$ Normalnatronlauge genügte zum Lösen), gelöst, durch Neutralisiren mit $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure ausgefällt; diese Procedur wurde wiederholt. Der so erhaltene Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen, getrocknet und zur Analyse verwandt. Selbstverständlich haben wir uns davon überzeugt, dass wir es nicht mit einer gefällten Chlorverbindung zu thun hatten: die Substanz mit Sodasalpeter geschmolzen erwies sich als fast chlorfrei.²⁾

1) Chromsäureprobe ergab noch einen Ueberschuss von H_2O_2 .

2) Die Spuren von Chlor sind auf unvollständiges Auswaschen zurückzuführen; man darf das Auswaschen nicht zu lange fortsetzen, da sonst erhebliche Mengen des Niederschlags sich lösen. Der nicht quantitativ bestimmte Chlorgehalt betrug sicher unter 0.1%.

Es wurden 2 vollständig getrennte Darstellungen vorgenommen.

Die Zusammensetzung des Präparates I war aschefrei berechnet:

C 50,85, H 6,74, N 14,62, S 1,2, O 26,6.1)

Die Zusammensetzung des Präparates II war aschefrei berechnet:

C 50,85, H 6,9, N 14,6, S 1,2, O 26,45.2)

Der analysirte Körper gibt, im Gegensatze zur Oxyprot-sulfonsäure, alle Gruppenreactionen der Eiweissstoffe.

Zunächst gibt er, wie nach den Befunden Chandelon's an den albumose- und peptonartigen Produkten, welche er bei Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd beobachtete, zu vermuthen war, in schönster Weise die Millon'sche Reaction. Selbst-

1) 1. C- und H-Bestimmung:

0,2454 g Substanz lieferten 0,4575 g CO_2 = 50,84% C

0,1420 „ H_2O = 6,43% H

0,3280 „ „ 0,6093 „ CO_2 = 50,66% C

0,2118 „ H_2O = 7,4% H.

2. Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0,2001 g Substanz lieferten 0,0295 g N = 14,74% N

0,1770 „ „ 0,0256 „ N = 14,47% N.

3. Schwefelbestimmung (mit Soda-Salpeter nach Ham-marsten):

0,4317 g Substanz lieferten 0,0386 g BaSO_4 = 1,2% Schwefel.

4. Aschebestimmung:

0,3111 g Substanz lieferten 0,0007 g Asche = 0,2%.

2) 1. C- und H-Bestimmung:

0,2788 g Substanz lieferten 0,5177 g CO_2 = 50,61% C

0,1660 „ H_2O = 6,6 % H

0,4029 „ „ 0,7521 „ CO_2 = 50,90% C

0,2615 „ H_2O = 7,2 % H.

2. Stickstoffbestimmungen (nach Kjeldahl):

0,4021 g Substanz lieferten 0,0595 g N = 14,8% N

0,3544 „ „ 0,05012 „ N = 14,2% N

0,2403 „ „ 0,0350 „ N = 14,6% N

0,1766 g „ 0,02632 „ N = 14,9% N.

3. Schwefelbestimmung (mit Soda-Salpeter nach Ham-marsten):

0,7050 g Substanz lieferten 0,0616 g BaSO_4 = 1,2% Schwefel.

4. Aschebestimmung:

0,3723 g Substanz lieferten 0,0008 g Asche = 0,2%.

verständlich muss man diese Reaction an Produkten prüfen, denen kein Wasserstoffsuperoxyd mehr anhaftet (also nicht an dem direkt gefällten Körper), da sonst die zum Zustandekommen der Reaction nöthige salpetrige Säure des Reagens oxydirt wird. Man muss eventuell durch Zusatz eines Ueberschusses von salpetriger Säure die Wirkung des H_2O_2 ausschalten. Die Oxyprotsulfonsäure gibt bekanntlich die Millon'sche Reaction nicht und liefert bei der Spaltung unter keinen Umständen Tyrosin. Das Oxyprotein verhält sich insofern eigenthümlich, als es uns ebenfalls nicht gelungen ist, bei der Spaltung Tyrosin zu erhalten, und zwar trotz des prächtigen Ausfalles der Millon'schen Reaction. (Weitere Untersuchungen hierüber sollen vorgenommen werden.)

Ferner wirkt das Oxyprotein, wie schon Wurster beobachtete, beim Kochen mit alkalischer Bleilösung bleischwärend. Die Oxyprotsulfonsäure wirkt unter gleichen Bedingungen nicht bleischwärend. Dieser Umstand veranlasste Maly bekanntlich, seinen Körper als Sulfonsäure zu bezeichnen, indem er annahm, dass der durch Alkali abspaltbare Schwefel innerhalb des Eiweissmoleküls eine Oxydation erfahren habe. Dieser Umstand war demnach für unsere Untersuchung principiell von der grössten Wichtigkeit. Es schien uns von ganz besonderem Interesse zu sein, bei dem Oxyprotein die Menge des als Schwefelwasserstoff abspaltbaren Schwefels quantitativ zu bestimmen. Die nach der Zinkmethode ausgeführten Bestimmungen hatten das wichtige Ergebniss, dass sich auch aus dem Oxyprotein die Hälfte des Schwefels durch Kochen mit Alkali als Schwefelwasserstoff abspalten lässt, also nicht in oxydirtter Form vorhanden ist; die gefundenen Werthe sind dieselben, wie beim Ausgangsmaterial.

	Menge des abspaltbaren Schwefels ¹⁾	Gesamt-S
Präparat I	0,48 %	1,2 %
Präparat II	0,55 %	1,2 %
kryst. Albumin	0,50 %	1,2 %

- 1) Präparat I: 0,5260 g Subst. lieferten 0,0185 g $BaSO_4 = 0,48\%$ S
 „ II: 1,0834 „ „ „ 0,0446 „ $BaSO_4 = 0,56\%$ S
 1,35 „ „ „ 0,0518 „ $BaSO_4 = 0,53\%$ S.

Man hat bisher den als SH_2 abspaltbaren Schwefel der Eiweissstoffe für leicht oxydirbar gehalten. Derselbe ist aber nur dann leicht oxydirbar, wenn er abgespalten ist. Die einzigen direkten Versuche über die Oxydirbarkeit des nicht abgespaltenen Schwefels beziehen sich gerade auf die Oxyprot-sulfonsäure.

Nach den Erfahrungen des einen von uns lag es nahe, zu prüfen, ob die Differenz zwischen dem Oxyprotein und Maly's sog. Oxyprot-sulfonsäure wirklich auf einer Differenz in der oxydirenden Wirkung beruhe, oder ob dieselbe nicht vielmehr auf die Einwirkung der nascirenden Kalilauge bei der Verwendung des Kaliumpermanganates zurückzuführen sei. Wir kamen zu dem Ergebniss, dass auch die Oxyprot-sulfonsäure, nach der Zinkmethode untersucht, noch reichliche Mengen abspaltbaren Schwefels enthält.

Zur Untersuchung gelangte eine genau nach den Vorschriften Maly's dargestellte Oxyprot-sulfonsäure. Die Zusammensetzung derselben ist nach den zahlreichen Analysen Maly's C 51,21, H 6,89, N 14,59, S 1,77, O 25,54.

Eine derartige Oxyprot-sulfonsäure enthält noch 0,33 % durch Alkali abspaltbaren Schwefel.¹⁾ Die Erklärung hierfür ist die, dass durch die Einwirkung der Lauge bei der Oxydation so viel Schwefel abgespalten wurde (und dann natürlich zu H_2SO_4 weiterhin oxydirt wurde), dass der noch verbleibende Rest abspaltbaren Schwefels in der Oxyprot-sulfonsäure durch weiteres Einwirken von Lauge so langsam abgespalten wird, dass er bei einfachem Kochen mit alkalischer Bleilösung nicht bleischwärend wirken kann, da die Oxydation des PbS zu PbSO_4 mit der Abspaltung gleichen Schritt hält.²⁾

Auffallend bleibt der hohe Gehalt an Gesamtschwefel,

1) 0,9270 g lieferten 0,024 g $\text{BaSO}_4 = 0,0033$ g S = 0,35 %,
 1,25 g „ 0,0285 g $\text{BaSO}_4 = 0,00391$ g S = 0,31 %.

2) Näheres hierüber lässt sich aus der Arbeit von Schulz »Ueber die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss« entnehmen.

welchen die Oxyprotsulfonsäure aufweist.¹⁾ Hierbei ist zunächst zu berücksichtigen, dass Maly (ebenso wie auch wir) bei der Darstellung der Oxyprotsulfonsäure von nicht gereinigtem Eiereiweiss ausging. Das nicht gereinigte Eiereiweiss enthält fast doppelt so viel Schwefel, wie das krystallisierte Eiereiweiss. Sodann ist vorläufig nicht abzusehen, ob und inwieweit bei der Oxydation mit Permanganat eine Abspaltung schwefelfreier Komplexe statt hat.

Die hier bestehende Lücke soll später ausgefüllt werden.

In Betreff der übrigen Gruppenreactionen der Eiweissstoffe können wir uns kürzer fassen. Das Oxyprotein gibt die Reaction von Adamkiewicz sowie die Reaction von Molisch in schönster Weise. Die Oxyprotsulfonsäure gibt nur die Reaction von Molisch mit α -Naphthol und Schwefelsäure, was wohl mit dem Fehlen der Millon'schen Reaction im Zusammenhang steht. Die Bedingungen für das Zustandekommen dieser beiden Reactionen sind zu wenig präcisirt, um für den vorliegenden Fall bestimmte Schlüsse ziehen zu können.

Die Liebermann'sche Reaction (Blaufärbung beim Kochen mit concentrirter Salzsäure) fehlt vollständig. Behandelt man Oxyprotein am Rückflusskühler mit concentrirter HCl, so condensirt sich im Kühlrohr eine blauviolette Masse, die sich allen versuchten Lösungsmitteln gegenüber indifferent verhielt. Auch hier können wir bestimmte Schlüsse aus den gemachten Beobachtungen nicht ziehen.

Das Verhalten gegenüber den gewöhnlichen Eiweissfällungsmitteln ist kurz folgendes:

Die frisch gefällte Substanz ist in sehr verdünnter Natronlauge ($\frac{1}{100}$ normal), Natriumcarbonat, Ammoniak leicht und vollständig löslich. Durch Kochsalz, Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat wird das Oxyprotein aus seiner, durch ein Minimum von Alkali erzeugten Lösung leicht gefällt; ebenso durch Neutralisiren mit Salzsäure, Salpetersäure, Schwefel-

¹⁾ Bondzynski und Zoja, welche von krystallisirtem Eieralbumin ausgehend Oxyprotsulfonsäure darstellten und analysirten, bestimmten leider nicht den Schwefelgehalt. (Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 225—238.)

säure, Essigsäure. Die Fällung ist im Ueberschuss von Mineralsäure nicht löslich; erst bei hoher Concentration an Mineralsäure tritt Lösung ein unter tiefgreifender Veränderung des Oxyproteins. Die Säurefällung löst sich im Gegensatz zur Oxyprotosulfonsäure (wie schon Wurster bemerkte, l. c.) nicht in Natriumacetat oder Natriumtartratlösung. Beim Füllen mit Säure bleiben für gewöhnlich Spuren von Eiweiss in Lösung, so dass das eventuell eingeeengte Filtrat die Biuretreaction gibt. (Das Oxyprotein zeichnet sich durch ganz besonders intensive Biuretreaction aus.) Je mehr Natronlauge man zur Lösung des Oxyproteins benutzt und je länger man mit Natronlauge in Berührung lässt, um so mehr Eiweiss entgeht bei Säurezusatz der Fällung. Bei raschem Arbeiten mit sehr verdünnter Natronlauge ist die Säurefällung eine vollständige.

Essigsäure und Ferrocyankalium, Phosphorwolframsäure, Trichlor-essigsäure, Pikrinsäure fallen naturgemäss in saurer Lösung. Die Pikrinsäurefällung löst sich beim Erwärmen nicht.

Die Substanz wird durch CuSO_4 , HgCl_2 , AgNO_3 nicht gefällt.

Die Lösung des Oxyproteins in Alkali gibt mit Alkohol, auch im grössten Ueberschuss, keine Fällung. Die durch Säure gefällte Substanz ist jedoch in Alkohol unlöslich.

Ueber die Natur des Oxyproteins möchten wir nach dem Vorstehenden hervorheben, dass dasselbe kein gewöhnliches Acidalbumin bezw. Alkalialbuminat ist, da erstens die Säurefällung sich im Ueberschuss von Säure nicht löst, und da zweitens die durch Säure oder auch durch Neutralsalz gefällte Substanz weder durch Siedehitze, noch durch Alkohol und Aether coagulirbar ist.

Wir haben den erhaltenen Körper als Oxyprotein bezeichnet. Dass es sich in der That um ein Oxydationsprodukt handelt, geht am deutlichsten aus der elementaren Zusammensetzung hervor. Der Sauerstoffgehalt ist durch den Einfluss des oxydirenden H_2O_2 von 23,9 % auf 26,5 % gestiegen, also um 2,6 %.

Das Verhältniss der übrigen Elemente zu einander ist genau dasselbe geblieben, wie in dem Ausgangsmaterial; wir haben also allen Grund zu der Annahme, dass es sich hier thatsächlich um ein reines Oxydationsprodukt handelt ohne wesentliche Abspaltungen. Hierfür spricht namentlich auch, dass alle Gruppenreactionen des Eieralbumins mit dem Oxyprotein noch zu Stande kommen.

Eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes unter gleichzeitiger Herabsetzung des Kohlenstoffgehaltes wäre natürlich auch möglich durch einfache Wasseraufnahme. Da aber im H_2O 11 % H enthalten ist, müsste gleichzeitig der H-Gehalt erhöht sein. Derselbe ist aber im Oxyprotein in demselben Maasse gesunken, wie der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffgehalt.

Die Frage, an welchem Punkte des Eiweissmoleküls die Oxydation einsetzt, können wir nicht beantworten; es hat vorläufig den Anschein, als ob eine vorher indifferente Gruppe durch Oxydation zu einer stärker sauren Gruppe geworden sei, wodurch der Gesamtcharakter des Eiweisses der einer starken Säure geworden ist. Eine genauere Untersuchung der Salzbildungsverhältnisse steht noch aus.

Den sauren Charakter hat das Oxyprotein mit der Oxyprotsulfonsäure gemeinsam; die Unterschiede gegenüber der Oxyprotsulfonsäure sind nicht Unterschiede in der Oxydation (weder quantitativ, noch qualitativ), sondern durch die Wirkung der nascirenden Kalilauge bedingt.

Leider ist das Verständniss unserer Versuche dadurch erschwert, dass die Wirkungsweise des H_2O_2 auf organische Verbindungen zur Zeit nur wenig bekannt ist. Ein genaues Studium dieser Verhältnisse würde nicht nur für die Kenntniss des Oxyproteins, sondern auch des Eiweisses überhaupt sehr lehrreich sein; speciell die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss dürfte hierdurch dem Verständnisse wesentlich näher gerückt werden. Hier dürfte es gerade von Vortheil sein, dass wir es in dem H_2O_2 mit einem gelinden Oxydationsmittel zu thun haben, namentlich wenn dasselbe bei neutraler Reaction zur Anwendung gelangt.¹⁾

V. Die Peptonbildung durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd.

Für die Beurtheilung des Oxyproteins ist es von Interesse, zu erfahren, ob die sowohl von Chandelon, als auch von Wurster beobachtete Peptonbildung eine reine Wirkung des

¹⁾ Wolffenstein citirt eine Angabe von Harden (Proceedings Chem. Soc. 15, 158), wonach selbst das so leicht oxydirbare Formaldehyd nur in alkalischer Lösung mit H_2O_2 reagirt.

Wasserstoffsuperoxyds ist oder nicht. Selbst wenn bei Einwirkung von reinem H_2O_2 diese Peptonbildung beobachtet würde, so würde allerdings das Oxyprotein doch, nach dem vorher Mitgetheilten, als reines Oxydationsprodukt aufzufassen sein, wobei dann die Fällbarkeit durch Säure eine genaue Abtrennung von den albumose- und peptonartigen Substanzen gestattete. Wir setzten von vorne herein Zweifel darein, dass durch reines H_2O_2 Peptonisirung des Oxyproteins erfolge. Wir waren hierzu berechtigt, da Chandelon selbst angibt, dass er bei alkalischer Reaction gearbeitet habe, und Wurster bei seinen Versuchen 1—2% Milchsäure anwandte. Nach den Erfahrungen bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat war es ausserdem wahrscheinlich, dass die Oxydation die peptonisirende Wirkung der Lauge (also auch wohl von Säuren) wesentlich unterstützte. Wir konnten unsere Vermuthung dann auch durch Versuche bestätigen.

Bei unseren Hauptdarstellungen des Oxyproteins verwandten wir käufliches, also schwach saures Wasserstoffsuperoxyd. Hierbei bildeten sich jedesmal relativ reichliche Mengen von Pepton. Der zweite Hauptversuch wurde, soweit angängig, quantitativ durchgeführt. Wir erhielten aus 86 g krystallisirtem Eiereiweiss 3,2 g Pepton.

86 g Eiereiweiss wurden mit H_2O_2 und etwas Platinmohr bei Brüttemperatur behandelt, bis eine abfiltrirte Probe beim Sieden keine Coagulation mehr zeigte. Dann wurde abfiltrirt und kurz mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat gab eine ausserordentlich intensive rothviolette Biuretreaction. Mit Säure war in demselben keine Fällung hervorzurufen; bei Zusatz von viel concentrirter Ammonsulfatlösung trat eine geringfügige Fällung auf. Das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat wurde eingedampft. Es hinterblieb ein nach dem Trocknen leicht pulverisirbarer Rückstand, der 3,2 g verbrennbare Substanz enthielt. Der Rückstand war in Wasser ausserordentlich leicht löslich. Aus der wässerigen Lösung konnte durch Alkohol der peptonartige Körper gefällt werden. Die Lösung des Rückstandes, sowie auch der Alkoholfällung gab schöne Biuretreaction und Millon'sche Reaction.

Ein Versuch, in der Lösung des Rückstandes durch Fällung mit Ammonsulfat (nach dem Pick'schen Verfahren)¹⁾ Albumosen nachzu-

1) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Diese Zeitschrift Bd. XXIV, 1897.

weisen und zu charakterisiren, führte zu keinem greifbaren Ergebniss. Es entstanden nur geringe Trübungen, und bei hoher Concentration an Ammonsulfat ein minimaler Niederschlag, der jedoch so gering war, dass sich nicht einmal seine Eiweissnatur feststellen liess. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass vielleicht erst secundär durch das Einengen bei Siedetemperatur die Peptonisation so vollständig geworden ist. Reichlichere Mengen von Albumosen waren jedoch sicher auch von vorne herein nicht vorhanden, da schon das ursprüngliche Filtrat (wie erwähnt) beim Sättigen mit Ammonsulfat nur geringfügige Fällung gezeigt hatte.

Wurde dagegen durch Destillation nach Wolfenstein¹⁾ gereinigtes Wasserstoffsuperoxyd (25 ccm. wurden durch 0,3 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-Alkali neutralisirt, s. auch Seite 93) verwandt, so bildete sich keine Spur von albumose- oder peptonartigen Substanzen. Bei Anwendung von Bruttemperatur und Platinmohr war die Ausfällung nach drei Wochen eine vollständige, so dass selbst das eingeeengte Filtrat keine Biuretreaction mehr gab.

Nach 8-, sowie nach 14tägiger Oxydation hatte das Filtrat noch Biuretreaction gegeben. Das gelöste Eiweiss war jedoch durch Ammonsulfat vollständig fällbar, und ausserdem auch noch durch Alkohol coagulirbar, denn der Ammonsulfatniederschlag, mit heissem Alkohol behandelt, gab an Wasser kein Eiweiss ab (Biureprobe).

Die bei Verwendung des schwach sauren käuflichen H_2O_2 beobachtete Peptonisation ist also als Nebenwirkung der Säure aufzufassen. Da 25 ccm. unseres käuflichen H_2O_2 zur Neutralisation 2 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-Alkali gebrauchten, so entspricht die angewandte Säure (wenn man die Verdünnung durch die wässrige Eiweisslösung nicht berücksichtigt) ca. $\frac{1}{100}$ Normalsäure. Nach den Untersuchungen von Goldschmidt²⁾ bewirkt $\frac{1}{16}$ Normal-Salzsäure in 48 Stunden bei 40° deutliche Bildung von primären und secundären Albumosen aus ungereinigtem Eiereiweiss; bis zur Bildung von Pepton schreitet die Einwirkung in 48 Stunden nicht fort.

Wenn wir bei Anwendung einer vielfach schwächeren Säure und im übrigen gleichen Versuchsbedingungen bei Gegenwart von H_2O_2 reichliche Peptonbildung beobachten konnten,

1) Wolfenstein, l. c.

2) F. Goldschmidt, Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe. Jnaug.-Dissert. Strassburg 1898. Tabelle I.

so geht daraus unzweifelhaft hervor, dass die Wirkung der Säure durch das Wasserstoffsuperoxyd wesentlich unterstützt worden ist. Dies kann in zweierlei Weise geschehen sein. Einmal dadurch, dass das durch reine Oxydation gebildete Oxyprotein leichter hydrolytischer Spaltung unterliegt. Dafür spricht der Umstand, dass das Oxyprotein auch durch sehr verdünnte Lauge ($1/100$ normal) leicht angegriffen wird. Sodann könnte aber auch das H_2O_2 selbst die hydrolytische Spaltung unterstützt haben, indem das beim Zerfall in $H_2O + O$ nascirende Wasser in Reaction getreten wäre. Dass eine derartige Wirkungsweise des H_2O_2 möglich ist, geht aus den Untersuchungen von Bumke und Wolfenstein¹⁾ hervor, wonach das Wasserstoffsuperoxyd auf Cellulose ausschliesslich hydrolysirend und nicht oxydirend wirkt, indem es den von ihnen Hydracellulose genannten Körper erzeugt. Möglicher Weise spielen beide Punkte eine Rolle. Der Umstand, dass Chandelon, der bei alkalischer Reaction arbeitete, so reichliche Peptonbildung beobachtete, ist wohl darauf zurückzuführen, dass bei alkalischer Reaction das Oxyprotein in Lösung blieb, also secundärer Spaltung leichter zugänglich war.

VI. Zusammenfassende Schlussbetrachtungen.

1. Durch Einwirkung von H_2O_2 auf Eiereiweiss entsteht ein neuer Körper (Oxyprotein), von dem allgemeinen Charakter der Oxyprotosulfonsäure, der nach seiner elementaren Zusammensetzung als Oxydationsprodukt aufzufassen ist.

2. Das Oxyprotein ist ein reines Oxydationsprodukt und stellt ein nicht durch Abspaltungen verändertes Eiweiss dar.

3. Die Oxyprotosulfonsäure steht auf derselben Oxydationsstufe wie das Oxyprotein. Die Unterschiede beruhen auf der abspaltenden Wirkung der Kalilauge. Dies geht hauptsächlich daraus hervor, dass der durch Alkali abspaltbare Schwefel des Eiweisses nicht oxydirt ist (wie Maly annahm), sondern nur so verringert ist, dass er erst durch feinere Methoden zum Nachweis gelangen kann.

¹⁾ G. Bumke u. R. Wolfenstein, Ueber Cellulose. Chem. Ber. Bd. XXXII, 2493—2507.

4. Die früher beobachtete Bildung von Pepton durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Eiweiss ist keine reine Wirkung des H_2O_2 , sondern beruht darauf, dass das H_2O_2 die hydrolysirende Wirkung von Säuren, bezw. Alkalien unterstützt und verstärkt.

5. Das nach dem Säureverfahren hergestellte krystallisirte Eiereiweiss unterscheidet sich in seiner elementaren Zusammensetzung von dem nach dem alten Hofmeister'schen Verfahren dargestellten, und zwar so, dass die Annahme einer Hydratbildung bei dem Säureverfahren naheliegt.

Unser gemeinschaftliches Arbeiten wurde durch den Weggang des Herrn Couvreur beendet. Auch aus diesem Grund habe ich mich schon jetzt zur Mittheilung unserer Untersuchungen entschlossen. Die Untersuchung wird fortgesetzt.

F. Schulz.

Jena, im November 1899.

Zur Kenntniss der brenzcatechinähnlichen Substanz der Nebennieren.

III. Mittheilung.

Von

Dr. Otto v. Fürth,

Privatdocenten und Assistenten des Instituts.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 24.)

(Der Redaction zugegangen am 23. Dezember 1899.)

Im vorigen Jahre habe ich in dieser Zeitschrift¹⁾ eine Reihe von Beobachtungen über die brenzcatechinähnliche Substanz der Nebennieren mitgetheilt, die mich zur Vermuthung führten, dass die Substanz ein hydrirtes Dioxypyridin von der Zusammensetzung $C_5H_7NO_3$ oder $C_5H_9NO_3$ sein dürfte. Vor wenigen Monaten ist nun, gleichfalls in dieser Zeitschrift,²⁾ eine Arbeit von John J. Abel, betitelt «Ueber den blutdruck-erregenden Bestandtheil der Nebenniere, das Epinephrin», erschienen, deren Ergebnisse denjenigen meiner Untersuchungen in wesentlichen Punkten widersprechen. Abel hält das Epinephrin, eine alkaloidartige, bei der Kalischmelze Skatol liefernde Substanz, von der Zusammensetzung $C_{17}H_{15}NO_4$ für den blutdrucksteigernden Bestandtheil der Nebennieren und spricht die Meinung aus, dass das von mir analysirte Produkt ein verunreinigtes Epinephrin gewesen sei. Dass die Sachlage

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 15.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 318. Vordem schon englisch: Bulletin of the John Hopkins Hospital, July 1897, S. 143 und Sept., Oct. 1898, American Journal of Physiology II, March 1, 1899.

keine so einfache sein könne, war schon dem Vergleiche der beiderseitigen Angaben zu entnehmen. Es musste sich da die Vermuthung aufdrängen, dass Abel einen anderen Stoff unter den Händen gehabt hat als ich. Aus den nachstehend angeführten Versuchen geht denn auch hervor, dass das von Abel in der Nebenniere aufgefundene und analytisch charakterisirte Epinephrin durchaus verschieden ist von dem von mir studirten brenzcatechinähnlichen Bestandtheile der Nebennieren, welcher letztere als der ausschliessliche Träger der blutdrucksteigernden Wirkung der Extracte anzusehen ist. Der Kürze wegen will ich für die von mir als wirksam angesprochene Substanz die Bezeichnung Suprarenin benutzen.

I. Vergleich des chemischen Verhaltens des Epinephrins und des Suprarenins.

Abel hat das Epinephrin in der Weise dargestellt, dass er Nebennierenextract benzoylirte und das gereinigte Benzoylprodukt im Autoclaven bei einem Drucke von 3—5 Atmosphären mit 1—2%iger Schwefelsäure verseifte. Aus den so erhaltenen Lösungen von hochgradiger physiologischer Wirksamkeit wurde das Epinephrin entweder durch sehr verdünntes Ammoniak, oder aber durch pikrinsaures Natron gefällt. Die Analysen des Epinephrins beziehen sich auf die Ammoniakfällung, auf das Pikrat, sowie auf Bisulfate, Hydrochlorate, Hydrobromate und Acetylverbindungen, die aus dem Pikrate dargestellt worden waren.

Ich untersuchte zunächst, ob nach dem von mir angegebenen Verfahren durch Fällung mit ammoniakalischem Blei oder ammoniakalischem Zink von den Höchster Farwerken dargestellte Präparate, welche eine äusserst wirksame, aber keineswegs reine Lösung des Suprarenins darstellen, eine Substanz vom Verhalten des Abel'schen Epinephrins enthalten. Es gelang in der That, aus ihnen durch Fällung mit sehr verdünntem Ammoniak oder mit pikrinsaurem Natron wenn auch nur geringe, so doch immerhin zur Identificirung ausreichende Mengen einer solchen Substanz zu erhalten.

Concentrirte (10 bis 25%ige) Lösungen jener Präparate

wurden mit stark verdünntem Ammoniak tropfenweise versetzt, wobei ein voluminöser brauner Niederschlag ausfiel. Die Filtrate der Ammoniakfällung enthielten das nunmehr von der Epinephrinbeimengung befreite Suprarenin.¹⁾ Selbst durch sorgfältigstes Auswaschen der Epinephrinniederschläge unter Verwendung eines Saugfilters gelang es nicht immer, die Suprareninbeimengungen, welche den harzigen Niederschlägen fest anhafteten und die, namentlich wenn die Epinephrinfällung in einer sehr concentrirten Lösung erfolgte, recht beträchtlich sein konnten, zu entfernen. Nöthigenfalls führte wiederholtes Lösen des Niederschlags in verdünnter Säure und neuerliche Fällung mit verdünntem Ammoniak zum Ziele.

Zum Zwecke der Darstellung eines Pikrates wurde der Ammoniakniederschlag in verdünnter Schwefelsäure gelöst und die Lösung mit pikrinsaurem Natron versetzt, wobei ein voluminöser gelbbrauner Niederschlag von harziger Beschaffenheit ausfiel.

Ich führe eine Reihe chemischer Reactionen, welche das so nach Abel dargestellte Produkt und das Suprarenin von einander unterscheiden, in tabellarischer Zusammenstellung an.

	Durch Ammoniak gefällte Substanz (Epinephrin)	Suprarenin
In Wasser	sehr schwer löslich	sehr leicht löslich.
Verdünntes Ammoniak	brauner, flockiger Niederschlag, im Ueberschuss löslich	keine Fällung; rosenrothe Färbung.
Eisenchlorid	keine Farben- reaction	smaragdgrüne Färbung in saurer, carminrothe in alkalischer Lösung.
Erwärmen mit ammonia- kalischer Silberlösung	keine Reduction	kräftige Reduction.

¹⁾ Ich habe mich durch Eindampfen des neutralisirten Filtrates der Ammoniakfällung überzeugt, dass auch nach hochgradiger Concentration desselben keine neuerliche Epinephrinfällung durch verdünntes Ammoniak erzielt werden kann.

	Durch Ammoniak gefällte Substanz (Epinephrin)	Suprarenin
Mandelin'sches Reagens (vanadinsaures Ammon in schwefel- saurer Lösung)	keine Farben- reaction	violettrothe, schnell ver- blassende Färbung.
Kalischmelze	Indol- oder Skatol- Geruch ¹⁾	kein Indol- oder Skatol- geruch.
Pikrinsäure	gelber, flockiger Niederschlag	keine Fällung.
Phosphorwolframsäure + Salzsäure	weisser, flockiger Niederschlag	„
Kaliumquecksilberjodid + Salzsäure	„	„
Conc. Zinkchloridlösung	„	„
Gerbsäure	„	„

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich in Uebereinstimmung mit meinen früheren Versuchen, dass die brenzcatechinähnliche Substanz (das Suprarenin) weder Skatol noch Indol liefert, auch durch die typischen Fällungsmittel der Alkaloide nicht gefällt wird. Da diese Eigenschaften dem Epinephrin Abel's zukommen, so ist an eine Identität von Epinephrin und Suprarenin nicht zu denken. Ferner ergibt sich, dass mit Ammoniak aus Nebennierenextracten eine Lösung erhalten werden kann, die in Betreff des Verhaltens bei der Kalischmelze und gegen Alkaloidreagentien mit Abel's Epinephrin zusammenfällt, die Farbenreactionen mit Eisenchlorid und mit Ammoniak, sowie das Reduktionsvermögen aber vermissen lässt. Abel's Epinephrin, wenigstens die «physiologisch wirksame Modification» desselben gibt, seiner

¹⁾ Dort, wo es sich darum handelt, kleine Mengen von Skatol nachzuweisen, empfiehlt es sich, die nahezu erkaltete Kalischmelze mit ein wenig Wasser zu versetzen. Skatolmengen, die sonst leicht der Beobachtung entgehen, können so am charakteristischen Geruche leicht erkannt werden.

Mittheilung nach, die Reactionen beider Körper. Der von mir dargestellte alkaloidartige, skatolliefernde Körper muss somit entweder vom Abel'schen Epinephrin verschieden sein, oder Abel hat ein mit Suprarenin verunreinigtes Produkt vorgelegen.

II. Wirkung auf den Blutdruck.

Für das durch Fällung mit Ammoniak erhaltene Epinephrin hat bereits Abel festgestellt, dass die Präparate nur so lange eine physiologische Wirksamkeit besitzen, als dieselben mit Jodwasser und Ammoniak eine Rosafärbung geben (S. 328). Dem oben Gesagten zufolge ist aber diese Reaction nicht dem durch Ammoniak fällbaren Skatolderivat, sondern dem Suprarenin eigenthümlich. Abel vermisste diese Reaction in der That bei einem Theile seiner Epinephrinpräparate und deutete diesen Befund durch die sonst nicht weiter gestützte Annahme der Existenz zweier Modificationen des Epinephrins, einer physiologisch wirksamen und einer unwirksamen. Abel fand ferner alle jene Verbindungen, die er aus dem durch Ammoniakfällung gewonnenen Epinephrin dargestellt hatte, sowohl Pikrate als auch Bisulfate, wirkungslos, welche Thatsache er derart erklärt, «dass die Bereitungsweise aus der freien Base Umlagerungen nicht ausschliesse» (S. 328).

Dagegen fand Abel Niederschläge wirksam, die er erhielt, indem er sein gereinigtes Benzoylprodukt im Autoclaven mit verdünnter Schwefelsäure spaltete und die Lösung nach Entfernung der Benzoësäure direkt mit pikrinsaurem Natron fällte. Die so erhaltenen «rohen Pikrate» erwiesen sich kräftig blutdrucksteigernd.

Ich habe aus 1 kg Rindsnebennieren das Benzoylprodukt nach der Vorschrift Abel's dargestellt und gereinigt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen, in Eisessig gelöst, die Lösung in Aether gegossen, die saure, ätherische Lösung durch Schütteln mit Wasser, Natronlauge, verdünnter Schwefelsäure, dann wieder mit Wasser gewaschen; sie hinterliess beim Eindunsten einen zähen, gelben Rückstand, der beim Eintrocknen spröde wurde. Das so gereinigte Produkt wurde 2 Stunden lang im Autoclaven bei 3—5 Atmosphären Druck

mit 2 %iger Schwefelsäure erhitzt. Eine Probe der vom ungelösten Rückstande abgossenen Flüssigkeit gab, wie es Abel beschreibt, auf Zusatz von Ammoniak eine rosenrothe Färbung. Die saure Lösung wurde durch Schütteln mit Aether von Benzoësäure befreit und der gelöste Aether auf dem Wasserbade vertrieben. Auf Zusatz einer gesättigten Lösung von pikrinsaurem Natron zu der erkalteten Flüssigkeit schied sich ein spärlicher feinflockiger, gelber Niederschlag ab. Dieser wurde abfiltrirt, einige Male mit Wasser gewaschen, sodann in 5 ccm. heissen Wassers gelöst.

Von der so bereiteten gelben Lösung bewirkte eine Injection von 2 ccm. in die Vene eines 2 kg schweren Kaninchens einen Anstieg des Blutdrucks von 110 auf 130 mm. in der Dauer von wenigen Secunden, ohne Aenderung der Pulsfrequenz und des Pulsvolumens. Eine weitere Injection von 1 ccm. veranlasste eine Drucksteigerung von 90 auf 110 mm.

Das mit Zinkoxyd neutralisirte Filtrat der Pikrinsäurefällung wurde zunächst (um festzustellen, ob nicht vielleicht Erhitzen bei Gegenwart von Pikrinsäure die physiologische Wirksamkeit zerstört) nahezu bis zur Trockne am Wasserbade eingedampft, sodann auf 50 ccm., also auf das 10fache Volumen der Lösung des Niederschlags, verdünnt. Von dieser Lösung bewirkte 1 ccm. einen steilen Anstieg des Druckes von 102 auf 150 mm., unter beträchtlicher Pulsverlangsamung und Verdoppelung der Grösse der einzelnen Pulse auf der Höhe der Curve, die langsam wieder zum Anfangswerthe abfiel.

In noch deutlicherer Weise wurde der Beweis dafür, dass auch die Pikrinsäure-Niederschläge eine etwaige Wirksamkeit nur der Beimengung von Suprarenin verdanken, durch nachstehende Versuche erbracht.

Die etwa 10procentige, äusserst kräftig wirksame Lösung eines nach der Bleimethode dargestellten Präparates wurde mit gesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung versetzt. Der voluminöse Niederschlag wurde auf einem Saugfilter gesammelt, sehr gründlich mit Wasser ausgewaschen und sodann in einigen Cubikcentimetern heissen Wassers gelöst. Die gesammte Menge

dieser Lösung, einem Kaninchen injicirt, bewirkte nicht die geringste Veränderung des Blutdrucks. Das Filtrat der Pikrinsäurefällung erwies sich dagegen so wirksam, dass noch nach Verdünnung desselben auf das 500fache des Ausgangsvolumens 1 ccm. der Lösung den Blutdruck eines Kaninchens um 80 mm. erhöhte.

Ein ganz analoges Resultat ergab ein Versuch mit einem nach der Zinkmethode dargestellten Präparat, wo die Fällung in einer 2% Schwefelsäure enthaltenden Lösung durch pikrinsaures Natron vorgenommen wurde. Auch hier erwies sich der sorgfältig auf dem Saugfilter ausgewaschene, in heissem Wasser gelöste Niederschlag absolut unwirksam, während das auf ein Vielfaches verdünnte Filtrat den Blutdruck eines Kaninchens kräftig in die Höhe trieb.

In einem weiteren Versuche wurde aus 10 ccm. der 25% igen Lösung eines nach der Zinkmethode dargestellten Präparates das Pikrat gefällt und der voluminöse Niederschlag derart gereinigt, dass er zweimal in heissem Wasser gelöst und durch Abkühlen wieder gefällt wurde. Das schliesslich erhaltene Präparat wurde in 10 ccm. heissen Wassers gelöst. 3 ccm. der erkalteten Lösung, einem Hunde von 6 kg Gewicht intravenös beigebracht, bewirkten nicht die geringste Veränderung des Blutdrucks. Das mit Natriumcarbonat neutralisirte Filtrat, das mit Pikrinsäure keine weitere Fällung gab, erwies sich dagegen so wirksam, dass, nach 50facher Verdünnung desselben mit Wasser, eine Injection von 2 ccm. den Blutdruck von 154 auf 240 mm. erhöhte.

Aus den angeführten Thatsachen ergibt sich mit Bestimmtheit, dass dem durch Pikrinsäure fällbaren Bestandtheil, dem Epinephrin, keine blutdrucksteigernde Wirkung zukommt.

III. Eisenverbindung des Suprarenins.

Die dem Suprarenin eigenthümliche Eisenreaction legte den Versuch nahe, die durch ihre schöne Färbung so scharf charakterisirte Eisenverbindung als solche zu isoliren und auf ihre physiologische Wirksamkeit zu prüfen.

FrISChe Rindsnebenieren wurden zerkleinert, mit Zinkstaub verrührt und durch wiederholtes Auskochen mit Wasser, dem einige Tropfen Schwefelsäure zugesetzt worden waren, extrahirt. Die filtrirte Extractionsflüssigkeit wurde eingedampft, der Rückstand mit Methylalkohol verrieben, die alkoholische Lösung mit einem Ueberschuss von neutralem Bleiacetat und aus dem Filtrat das Suprarenin durch ammoniakalisches Blei gefällt. Der Niederschlag wurde mit verdünntem Ammoniak gewaschen, in Methylalkohol suspendirt und durch Zusatz von concentrirter Schwefelsäure zersetzt. Die von schwefelsaurem Blei befreite methylalkoholische Lösung wurde mit Eisenchlorid versetzt und nun durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak neutralisirt. Der entstandene dunkelgefärbte, mit Ammonsulfat vermengte Niederschlag wurde abfiltrirt und das smaragdgrün gefärbte Filtrat durch weiteren Zusatz von Ammoniak alkalisch gemacht. Dabei schied sich die Eisenverbindung des Suprarenins in Form carminrother Flocken ab; der darüberstehende Alkohol erschien nur schwach röthlich gefärbt. Der Niederschlag wurde sogleich abfiltrirt, mit Methylalkohol gewaschen, sodann in stark verdünnter Essigsäure gelöst.

Die prachtvoll smaragdgrün gefärbte Lösung enthielt 0,0075 g Trockensubstanz im Cubikcentimeter. Eine Probe zeigte beim vorsichtigen Zusatz von Ammoniumcarbonat in typischer Weise den Farbenumschlag in Carminroth mit schönen blauen Zwischentönen und reducirte ammoniakalische Silberlösung sehr kräftig. Auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure verschwand die Grünfärbung; die nunmehr gelbbraune Flüssigkeit nahm auf Zusatz von vanadinsaurem Ammon eine schön violettrothe, schnell ablassende Färbung an.

1 ccm. der 100fach verdünnten Lösung (enthaltend 0,000075 g) erhöhte den Blutdruck eines 2 kg schweren Kaninchens von 100 auf 124 mm. unter Verlangsamung und Vergrößerung der Herzaction.

1 ccm. der 50fach verdünnten Lösung (0,00015 g) erhöhte den Druck von 110 auf 176 mm. unter Vergrößerung der Pulse auf das 3fache. Nach Abklingen der Wirkung sank der Druck auf 84 mm. herab.

1 ccm. der 10 fach verdünnten Lösung (0,00075 g) erhöhte den Druck von 94 auf 170 mm. unter Vergrösserung der Pulse auf das 3fache; nachdem der Druck auf 84 mm. herabgesunken war, erhob er sich spontan wieder auf 112 mm.

1 ccm. der unverdünnten Lösung (0,0075 g) bewirkte einen Anstieg auf 178 mm. unter Pulsverlangsamung und Vergrösserung der Pulse auf das 3fache. Die grossen Schwankungen hielten, von einzelnen unregelmässigen Pulsen unterbrochen, etwa 3 Minuten lang an; dann nahmen sie normale Grösse und Frequenz an, während der Druck ganz langsam und allmählich abzusinken begann; nach 5 Minuten betrug er noch 140 mm., nach 8 Minuten 135 mm., nach 12 Minuten 130 mm., nach 18 Minuten hatte er den Anfangswerth von 112 mm. erreicht, sank im Laufe der nächsten Zeit noch auf 100 mm. herab, um nach einigen Minuten sich wieder auf 110 mm. zu erheben.

Es ergibt sich sonach, dass bereits die Dosis von 0,000075 g pro Kilogramm Thier die maximale Drucksteigerung hervorgebracht hatte. Die 50fache Dosis hatte nur den Effect, den zeitlichen Verlauf der Blutdrucksteigerung bedeutend zu verlängern und zwar zu einer in früheren Versuchen niemals beobachteten Wirkungsdauer. Auffallend war weiter in diesem Falle das Fehlen toxischer Symptome, die sich in anderen Versuchen bereits bei bedeutend kleineren Dosen durch ein tiefes Absinken des Druckes unter den Anfangswerth nach Abklingen der Blutdrucksteigerung zu erkennen gaben. Diese Erscheinungen machen den Eindruck, als ob sich die physiologische Wirkung nicht auf einmal, sondern allmählich entfaltete, und legen den Gedanken nahe, dass der physiologischen Wirkung eine Dissociation der Suprarenin-Eisenverbindung vorangehe.

Bei einem andern Versuche ging ich derart vor, dass ich die Bleiverbindung, wie oben beschrieben, darstellte und zersetzte. Aus der mit Natriumcarbonat neutralisirten alkoholischen Zersetzungsflüssigkeit wurde durch Eisenchlorid die Eisenverbindung des Suprarenins gefällt, der mit Methylalkohol gewaschene Niederschlag in Wasser gelöst, die filtrirte Lösung mit Methylalkohol gefällt, der Niederschlag abfiltrirt und nun-

mehr in mit Salzsäure bzw. concentrirter Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst.

Während essigsaure; smaragdgrüne Lösungen der Verbindung sich nach längerem Stehen unter Abscheidung eines dunkelgefärbten Niederschlags trüben, blieb die schwefelsaure und die salzsaure, gelbbraune Lösung beim Aufbewahren wochenlang unverändert. Die schwefelsaure Lösung gab mit Phosphorwolframsäure keinen Niederschlag; Phosphormolybdänsäure bewirkte Grünfärbung, aber keine Fällung. Beim vorsichtigen Neutralisiren färbte sich die Flüssigkeit smaragdgrün, ammoniakalische Silberlösung wurde kräftig reducirt. Eine grössere Menge der Flüssigkeit wurde mit Zinkoxyd eingedampft und der Rückstand vorsichtig mit Kali geschmolzen; ein skatolartiger Geruch war weder unmittelbar, noch nach Zusatz von Wasser wahrnehmbar.

Zum Zwecke physiologischer Versuche wurde die salzsaure Flüssigkeit tropfenweise mit Sodalösung bis zum Auftreten der smaragdgrünen Färbung versetzt.

Von der so erhaltenen Suprarenin-Eisenverbindung bewirkte bei einem 6 kg schweren Hunde eine intravenös beigebrachte Dosis von 0,0001 g einen Anstieg des mittleren Blutdruckes von 174 mm. auf 220 mm. Die Dauer der von Vergrößerung und Verstärkung der Herzaction begleiteten Drucksteigerung betrug etwa eine Minute.

Eine Dosis von 0,0006 g bewirkte unter erheblicher Pulsverlangsamung einen Anstieg des mittleren Druckes von 166 mm. auf 210 mm. Die einzelnen Herzactionen waren so vergrößert, dass die Spitzen der Pulselevationen die Höhe von 280 mm. erreichten. Die Dauer der Drucksteigerung betrug $2\frac{1}{2}$ Minuten.

Eine Dosis von 0,006 g bewirkte einen Anstieg des mittleren Druckes von 170 auf etwa 220 mm. unter ausserordentlicher Verlangsamung und Verstärkung der Herzaction. Die Höhe der Pulselevationen konnte nicht festgestellt werden, da das Quecksilber aus dem Manometer geschleudert wurde. Die Periode der Vaguspulse dauerte 8 Minuten. Nach Abklingen der Wirkung sank bei frequenter Herzaction der Druck auf 120 mm. ab.

Eine Dosis von 0,012 g hatte einen ähnlichen Effect. Auf der Höhe der Wirkung wurde das Quecksilber aus dem Manometer geschleudert. Die Periode der Vaguspulse währte 14 Minuten.

In diesem Falle hatte also bereits eine Dosis von 0,000017 g der Suprarenin-Eisenverbindung pro Kilogramm Thier die durch den mittleren Blutdruck angezeigte maximale Gefässwirkung hervorgebracht. Eine weitere Steigerung der Dosis führte zu einer Vergrösserung und Verlangsamung der Herzaction von um so grösserer Dauer und Intensität, je höher die angewandte Dosis gewesen war.

Die Versuche beweisen endgültig die Identität der blutdrucksteigernden Substanz mit dem eisen-grünenden brenzcatechinähnlichen Bestandtheile der Nebennieren, dem Suprarenin.

Colorimetrisches Verfahren zur Schätzung des Suprarenin- gehaltes der Nebennieren.

Die Eisenverbindung des Suprarenins besitzt insofern einen gewissen Grad von Haltbarkeit, als sowohl die sauren smaragdgrünen, als auch die alkalischen carminrothen Lösungen sich Stunden lang ohne sichtliche Veränderung aufbewahren lassen. Die Haltbarkeit ist eine ausreichende, um den Versuch zu rechtfertigen, die schöne Färbung zu einer, wenn auch nur approximativen Schätzung des Suprarenin-gehaltes der Nebennieren zu verwerthen. Nach mannigfachen Vorversuchen ergab sich mir nachstehendes Verfahren als zweckmässig, das auf dem colorimetrischen Vergleiche der Suprarenin-Eisenverbindung in alkalischer Lösung mit der analogen Eisenverbindung des Brenzcatechins beruht.

Eine oder mehrere Rindsnebennieren wurden unter Vermeidung von Verlusten zerkleinert und unter Zusatz von Zinkstaub mit etwa 20 ccm. 1%iger Zinksulfatlösung ausgekocht; die Flüssigkeit wurde durch ein Filter in einen Messkolben gegossen und der coagulirte Rückstand noch dreimal mit siedendem Wasser ausgezogen. Die vereinigten Filtrate wurden auf das Volumen von 100 ccm. gebracht und von dieser Lösung 20 ccm. abgemessen, mit 1 ccm. einer alkalischen Seignettesalzlösung (180 g Natriumcarbonat und 240 g Seignettesalz im Liter enthaltend) und sodann mit 0,3 ccm. einer 5%igen Eisenchloridlösung versetzt. Die so erhaltene schön carminrothe Flüssigkeit wurde, nach dem von Hoppe-Seyler angegebenen Verfahren, mit Hilfe der colorimetrischen Doppelpipette mit einer 0,1%igen Brenzcatechinlösung verglichen, von der je 20 ccm. 1 ccm. der Seignettesalzlösung und 0,5 ccm. der Eisen-

chloridlösung enthielten. Der Zusatz der Reagentien erfolgte unmittelbar vor der Bestimmung. Durch Wiederholung des Verfahrens mit neu abgemessenen Portionen gelang es, gut unter einander stimmende Parallelbestimmungen zu erhalten. Die angegebenen Verhältnisse müssen genau eingehalten werden, da sonst die colorimetrische Beobachtung durch Ungleichheit der Farbtöne erheblich erschwert ist. Ich führe die Ergebnisse der Versuchsreihe tabellarisch an.

Zahl der verarbeiteten Nebennieren	Gewicht der Nebennieren	Eine Nebenniere enthält Suprarenin ¹⁾	
		Gramm	Procent
5	62	0,021	0,17
1	20	0,026	0,13
1	25,5	0,026	0,10
1	12,4	0,018	0,14
1	16,8	0,023	0,14

IV. Wirkung subcutaner Suprarenininjectionen.

Ueber die Wirkung von Nebennierenextracten bei subcutaner Application liegen widersprechende Angaben vor. Foa und Pellacani²⁾ beobachteten die Giftigkeit des auf diesem Wege beigebrachten Nebennierenextractes und schrieben demselben eine lähmende Wirkung auf nervöse Centren zu, welche Wirkung von Marino-Zucco, Guarnieri und Dutto³⁾ auf Neurin bezogen wurde. Oliver und Schäfer⁴⁾ sahen Kaninchen nach Subcutaninjection grosser Dosen von Nebennierenextract theils schnell, theils langsam zu Grunde gehen und beobachteten gelegentlich tiefe prämortale Temperatursenkungen. Cybulski⁵⁾ machte eine Einwirkung auf das vasomotorische Centrum verbunden mit Anämie des Centralnervensystems und

1) Dieser Berechnung liegt die vorläufige Annahme zu Grunde, dass die Eisenverbindung des Suprarenins $[\text{C}_9\text{H}_5\text{N}(\text{OH})_2 = 113]$ eine annähernd gleiche färbende Kraft besitze, wie jene des Brenzcatechins $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2 = 110]$.

2) Arch. per le scienze med., III, 1879, IV, 1880 und VII, 1883.

3) Chem. Cbl. 1888. Moleschott's Beitr. XIV. Arch. ital. de Biologie X.

4) Journ. of Physiology XVIII. 1895.

5) Anzeiger der Akad. der Wiss. in Krakau, 4. März 1895.

eine **Hyperämie** der Lungen für die toxische Wirkung der **Nebennierenextracte** verantwortlich. Gourfein¹⁾ beobachtete **Störungen der Respiration** und **Herzaction**, **Vaguslähmung** und **allgemeine Prostration**. Neuerdings hat Swale Vincent²⁾ auf Schäfer's Veranlassung die Wirkung **subcutan injicirten Nebennierenextracts** zum Gegenstande einer eingehenden Untersuchung an **Fröschen**, **Ratten**, **Mäusen**, **Meerschweinchen** und **Kaninchen** gemacht. Swale Vincent beobachtete jeweilig eine von rückwärts nach vorn fortschreitende **centrale Lähmung**, **Blutungen aus Maul und Nase**, **Hämaturie**, **Dyspnoe** und ferner zuweilen **Convulsionen**, sowie tiefe **prämortale Temperatursenkungen**.

Bisher war im Allgemeinen angenommen worden, dass im Gegensatz zur Wirkung **intravenöser Injectionen** auf dem Wege **subcutaner Application** kein ausgesprochener Einfluss auf den **Blutdruck** ausgeübt werden könne. Durch die von mir angewandten **Darstellungsmethoden** wurde ich in den Stand gesetzt, mit **sehr concentrirten Suprareninlösungen** zu experimentiren. Ich habe mich nunmehr überzeugt, dass es nur der **Anwendung entsprechend grosser Dosen** bedarf, um auch auf **subcutanem Wege** ähnliche **Drucksteigerungen** wie bei **intravenöser Application** zu erzielen. Da dabei merkwürdige **Vergiftungserscheinungen** auftraten, dürfte eine genauere Beschreibung dieser Versuche, die zum Theile in Gemeinschaft mit Prof. Gottlieb im **pharmakologischen Institute in Heidelberg** ausgeführt worden sind, gerechtfertigt erscheinen.

Bei einem **Kaninchen** von $1\frac{1}{2}$ kg Gewicht trat nach **subcutaner Injection** von 0,1 **Suprarenin** (1 ccm. einer 10%igen Lösung) nach Ablauf einer Minute eine **hochgradige Verlangsamung der Herzaction** (von 44 Schlägen auf 10 in 10 Minuten) und eine **Vergrösserung der Pulse** auf. **Gleichzeitig begann der Druck langsam anzusteigen**, worauf die **Pulse kleiner und frequenter wurden**. Nach 8 Minuten hatte der Druck seinen **Höhepunkt erreicht**; er war von 114 auf 148 mm. angestiegen. Die **Pulse waren nicht wesentlich grösser und frequenter als im Beginn des Versuchs**. Jetzt begann der Druck langsam abzusinken; nach 15 Minuten betrug er 125 mm. Nun aber stellte sich, ohne gleichzeitige Aenderung der Herzaction, eine **colossale Dyspnoe** ein. Die **Respirations-**

¹⁾ Comptes rendus 1895.

²⁾ Journ. of Physiology XXII, 1897.

frequenz (bis dahin 88—95 in der Minute) stieg plötzlich auf 200 an. Das Thier wurde vom Kymographion entfernt; die Dyspnoe hielt an und 1 1/4 Stunden nach der Injection erfolgte der Tod unter Austritt von Flüssigkeit aus Maul und Nase.

Ein mittelgrosses Kaninchen erhielt 0,1 g Suprarenin subcutan. Der Druck stieg im Laufe einer halben Minute unter Vergrösserung und Verlangsamung der Pulse von 120 auf 160 mm. empor; der Anstieg war von einzelnen tiefen Senkungen unterbrochen; die grossen, etwas unregelmässigen und anacroten Pulse dauerten 1 Minute an; dann wurden die Pulse klein, sehr frequent und unregelmässig, während der Druck sich weiter auf 180 mm. erhob, um dann im Laufe einer halben Stunde zur Norm abzusinken. Im absteigenden Aste der Curve fiel der Mangel respiratorischer Schwankungen auf. Eine weitere intraperitoneale Injection von 0,1 Suprarenin beeinflusste den Blutdruck nicht im geringsten. Nach etwa 3/4 Stunden wurde der Versuch abgebrochen, ohne dass auffallende Erscheinungen von Seiten der Respiration sich bemerkbar gemacht hätten.

Aehnliche Erscheinungen traten bei einem Kaninchen von 2 kg Gewicht nach subcutaner Injection von 0,2 g Suprarenin (2 ccm. einer 10%igen Lösung) auf. Der Druck stieg hier jedoch sehr langsam im Laufe von 25 Minuten von 120 auf 160 mm. Sodann machten die bis dahin langsamen, grossen und etwas unregelmässigen Herzactionen plötzlich sehr frequenten und kleinen Pulsen Platz, während sich der Druck gleichzeitig auf 180 mm. erhob, um dann langsam und regelmässig zum Anfangswerthe abzusinken, der erst nach Ablauf einer Stunde erreicht wurde. Auch hier waren keine auffallenden respiratorischen Symptome zu bemerken.

Ein Kaninchen von 1950 g verfiel 20 Minuten nach subcutaner Injection von 0,1 g Suprarenin in heftige Dyspnoe, stürzte zur Seite und starb innerhalb weniger Minuten unter leichtem Opisthotonus.

Bei einem Kaninchen von 2 kg Gewicht trat 25 Minuten nach subcutaner Injection von 0,2 g Suprarenin heftige Dyspnoe auf (160 in der Minute). Es sank zur Seite und machte vergebliche Versuche, sich zu erheben; die Pupillen waren stark erweitert und von träger Reaction. 1 1/4 Stunden nach der Injection war die Respirationsfrequenz auf 130 abgesunken; die Athmung erfolgte stossweise; die Pupillen waren enger geworden. Die Athmung wurde immer langsamer und tiefer und 1 St. 55 Min. nach der Injection trat der Tod unter leichtem Opisthotonus ein.

Ein Hund von 6 1/2 kg Gewicht erhielt 0,2 g Suprarenin subcutan, wenige Minuten nach der Injection war die Zahl der Herzpulsationen von 120 auf 60 in der Minute abgesunken; die Herzthätigkeit war bedeutend verstärkt, unregelmässig und, wie auscultatorisch festgestellt wurde, von ausgesprochenem Typus bigeminus. Von der Injection angefangen nahm die Respirationsfrequenz beständig zu; nach 20 Minuten

war sie auf 70, nach 30 Minuten auf 90 Athemzüge in der Minute angestiegen; nach 40 Minuten erreichte die Dyspnoe ihren Höhepunkt (130), gleichzeitig erfolgte Erbrechen; dann nahm die Respirationsfrequenz ab und betrug nach 1 1/2 Stunden wieder 60; die bis dahin anhaltend verlangsamte und arhythmische Herzaction wurde wieder annähernd normal. Das Thier zeigte nach einem Stadium allgemeiner Unruhe Zeichen von Prostration, die bis zu dem 2 Tage später erfolgten Tode anhielt. Von der Injectionsstelle ausgehend hatte sich eine jauchige Infiltration des Unterhautzellgewebes mit Hautemphysem ausgebildet.

Ein höchst auffallendes Vergiftungsbild ergab nachstehender Versuch:

Ein Hund von 7 1/2 kg Gewicht erhielt 0,1 g Suprarenin subcutan. Es zeigten sich keine besonderen Erscheinungen; nur schien das Thier traurig und verweigerte die Nahrung. Am nächsten Tage fand sich an der Injectionsstelle ein zweimarkstückgrosser runder Substanzverlust mit steilen Rändern. Eine weitere Injection von 0,15 g Suprarenin hatte keinen Effect. Einen halben Tag darauf erhielt das Thier 0,2 g Suprarenin subcutan injicirt. Nunmehr entwickelte sich eine von Pulsverlangsamung und Herzarhythmie begleitete heftige Dyspnoe, die nach 15 Minuten ihren Höhepunkt (205 Athemzüge in der Minute) erreichte, um dann langsam wieder abzunehmen. Auf der Höhe der Dyspnoe erfolgte Erbrechen. Nach 1/2 Stunde hatten Puls und Respiration wieder ihre normale Beschaffenheit angenommen; nun zeigte sich aber bei dem Thiere, das schon vorher Zeichen von Prostration erkennen liess, eine krampfartige Streckung der hinteren Extremitäten, während die vorderen Extremitäten schlaff blieben und die Bewegungen des Kopfes und des Schwanzes unbehindert schienen. Am folgenden Morgen bot das Thier folgendes Bild: es lag auf der Seite; in Pausen von 1/2—1 Minute erfolgten heftige clonische Zuckungen unter Betheiligung der Extremitäten-, Nacken-, Ohr- und Kaumuskeln. Die Pupillen waren weit und reagirten träge; der Cornealreflex war erhalten. Die Patellarreflexe, sowie auch die Periostr- und Sehnenreflexe der vorderen Extremitäten waren gesteigert; auch bestand leichter Fussclonus. Die Empfindlichkeit der Haut gegen Nadelstiche war herabgesetzt. Die Krämpfe konnten durch sensible Reize nicht ausgelöst werden. Der Puls war stark verlangsamt (48), klein und arhythmisch, die Temperatur im Rectum auf 25° (!) herabgesunken. Im Laufe des Tages nahm die Häufigkeit und Intensität der Krämpfe ab und 22 Stunden nach der letzten Injection trat der Tod ein. Bei der Section fanden sich hämorrhagische Erosionen im Magen und das Bild einer hämorrhagischen Enteritis im Rectum.

Es würde einer ausgedehnteren Versuchsreihe an Hunden bedürfen, um festzustellen, unter welchen Verhältnissen sich dieser merkwürdige Symptomencomplex, dessen Aehnlichkeit mit dem Bilde der Tetanie nach Schilddrüsenexstirpation beim Hunde auffallend ist, entwickelt.

V. Wie ist die Wirksamkeit der Abel'schen Epinephrinpräparate zu erklären?

Die ausserordentliche Kleinheit der Suprarenindosen, die dem Gesagten zufolge genügen, um bei intravenöser Application eine kräftige Blutdrucksteigerung herbeizuführen, bietet die Erklärung dafür, dass Abel einen Theil seiner Präparate und zwar die minder gereinigten wirksam fand.

Ich habe bereits oben darauf hingewiesen, dass Epinephrin-Niederschläge, insbesondere wenn sie in concentrirten Suprareninlösungen ausfallen, regelmässig nicht unerhebliche Mengen Suprarenin einschliessen und sich selbst durch andauerndes Waschen nicht immer davon befreien lassen. Es kann demzufolge nicht auffallend erscheinen, dass die, wie Abel ausdrücklich hervorhebt, «rohen» Pikrate des Epinephrins auch in ziemlich kleinen Dosen kräftig blutdrucksteigernd wirken (S. 329). Uebrigens gibt Abel auf Grund seiner Analysen selbst an, «dass das wirksame Pikrat noch mit verschiedenen Substanzen verunreinigt sei».

Anders verhält es sich mit einem etwa 10 Mal wirksameren von Abel dargestellten «Bisulfat». Zur Darstellung dieses Präparates ging Abel nicht vom Pikrinsäure-Niederschlag aus, wie man es bei Prüfung einer durch Pikrinsäure fällbaren Substanz zunächst erwarten würde, sondern vielmehr von dem, wie er angibt, noch überaus wirksamen Filtrate der Pikrinsäurefällung (S. 338). Das Filtrat wurde mit Essigäther ausgeschüttelt und die Essigätherlösung nach Zusatz von alkoholischer Schwefelsäure mit dem 4—6fachen Volumen Aethyläther gefällt (S. 380). Dieses Präparat bewirkte, einem Hunde intravenös injicirt, in einer Menge von 0,000018 g pro Kilogramm Körpergewicht eine Drucksteigerung von 16 mm., in der 5—6fachen Menge, also etwa 0,0001 g pro Kilogramm, eine sehr bedeutende und lang anhaltende Blutdrucksteigerung.

Man kann sich nun leicht davon überzeugen, dass, trotzdem das Suprarenin in reinem trockenen Zustande in Essigäther kaum löslich ist, beim Ausschütteln einer concentrirten sauren Lösung mit Essigäther nicht unerhebliche Mengen Suprarenin

in den wasserhaltigen Essigäther übergehen. Das Suprarenin wird durch Aether leicht aus seinen Lösungen gefällt. Bei dem Vorgehen Abel's musste das aus dem physiologisch sehr wirksamen Pikrinsäure-Filtrat durch Essigäther aufgenommene Suprarenin durch den Zusatz von viel Aether nebst anderen in Aether unlöslichen Substanzen niedergeschlagen werden. Es ist demnach leicht verständlich, dass Abel den Aether-niederschlag, der jedenfalls viel Suprarenin enthielt, kräftig blutdrucksteigernd fand. Was die Wirksamkeit des Präparates betrifft, erinnere ich daran, dass die von mir dargestellte Suprarenin-Eisenverbindung bei einem Hunde bereits in einer Dosis von 0,000017 pro Kilogramm Thier die maximale Gefässwirkung herbeiführte, und dass, wie aus meiner früheren Arbeit ¹⁾ hervorgeht, Mengen von 0,000025 des freien Suprarenins bei Kaninchen den Druck mächtig in die Höhe trieben.

Als Abel dieses «Bisulfat» analysirte, fand er in der That, gegenüber der berechneten Formel des Epinephrin-Bisulfats, ein Deficit von etwa 4% Kohlenstoff, was er durch Aufnahme von $1\frac{1}{2}$ Molekül Wasser erklärt.²⁾

Das aus dem Pikrinsäure-Niederschlag dargestellte Bisulfat wird gleichfalls als «wirksam» bezeichnet; doch werden keine darauf bezüglichen experimentellen Daten angeführt. Auch in diesem Falle musste bei der Darstellung vom Pikrinsäure-Niederschlag mitgerissenes Suprarenin dem durch Aetherfällung dargestellten Bisulfat anhaften.

Als weitere physiologisch active Präparate werden das Epinephrin-Hydrochlorat und -Hydrobromat angeführt. Dieselben wurden aus der Lösung des wirksamen Pikrats in Essigäther durch Versetzen mit alkoholischer Lösung von Chlor- oder Bromwasserstoffsäure erhalten. Auch die physiologische Wirksamkeit dieser Präparate erklärt sich ungezwungen aus einer Beimengung von Suprarenin, welches eben allen Niederschlägen anhaftet. Ueber die wirksame Minimaldosis dieser Präparate wird nichts mitgetheilt. Dass aber die physiologische

¹⁾ l. c. S. 23.

²⁾ Der Stickstoffgehalt wurde nicht bestimmt.

Wirksamkeit keine allzugrosse war, ergibt sich aus dem Umstande, dass ein Kaninchen die intravenöse Injection von 34 mg Epinephrin-Hydrochlorat, ein anderes eine einmalige Injection von 50—60 mg des Salzes vertrug und erst durch eine zweite nachfolgende gleiche Dosis getödtet wurde. (S. 354). Ich sah bei meinen früheren Versuchen¹⁾ ein Kaninchen nach einer Dosis von 5 mg Suprarenin augenblicklich zu Grunde gehen.

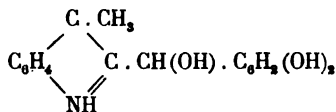
Aus den angeführten Thatsachen ergibt sich also, dass Abel's Epinephrin und die brenzcatechinähnliche Substanz, das Suprarenin, durchaus verschiedene Substanzen sind und dass die blutdrucksteigernde Wirkung nur dem Suprarenin eigenthümlich ist.

Es kann demnach nicht befremden, dass Abel's Analysenzahlen, die ihn zur Aufstellung der Epinephrin-Formel $C_{17}H_{15}NO_2$ ²⁾ führten, von meinen analytischen Ergebnissen, die sich auf das Acetylprodukt des Suprarenins beziehen, gänzlich abweichen.

Wie ich seinerzeit hervorgehoben habe, geht aus dem Umstande, dass meine Analysenzahlen innerhalb ziemlich weiter Grenzen schwankten, hervor, dass ich keine chemisch völlig einheitlichen Präparate in Händen hatte. Wenn ich trotzdem eine, wenn auch nur vorläufige Muthmassung über die chemische Constitution des Suprarenins ausgesprochen habe, so geschah dies nur mit aller Reserve und wesentlich, um dem Bedürfniss zu genügen, die gefundenen chemischen Thatsachen in einen möglichst einfachen Ausdruck zusammenzufassen. Wie wünschenswerth es wäre, bessere Anhaltspunkte zur Beurtheilung der Constitution des Suprarenins zu gewinnen, kann Niemand

1) l. c. S. 24.

2) Die von Abel für das Epinephrin aufgestellte muthmassliche Constitutionsformel



ist durch den Nachweis, dass das Epinephrin mit der brenzcatechinähnlichen Substanz, dem Suprarenin, nichts gemein hat, unhaltbar geworden.

lebhafter empfunden haben, als ich. Leider erfüllt Abel's in anderer Richtung interessante Mittheilung diesen Wunsch nicht. Aber es war denkbar, dass sie wenigstens zur Aufklärung meiner schwankenden Analysenresultate beitragen könnte.

Da das Acetylepinephrin der Acetylverbindung des Suprarenins in seinem Verhalten gegen Lösungsmittel ähnlich ist, erschien es nicht ausgeschlossen, dass eine Beimengung von Acetylepinephrin an der mangelhaften Uebereinstimmung der Analysen meiner Acetylprodukte mitschuldig war.

Abel gibt an, dass die Nebennieren nur etwa 0,01 % Epinephrin enthalten, während ich die Menge des Suprarenins, wie oben erwähnt, nach der Färbekraft der Eisenreaction auf 0,1—0,17 % schätze. Ich habe gefunden, dass ein nach der Zinkmethode dargestelltes Suprareninpräparat, das besonders reich an Epinephrin war, in Wirklichkeit nur 1,2 % davon enthielt. ¹⁾ Es ist demzufolge zweifelhaft, ob gerade eine Beimengung von Epinephrin jene analytischen Abweichungen veranlasst hat. Immerhin beabsichtige ich, sobald es mir gelungen sein wird, ausreichendes Versuchsmaterial zu sammeln, epinephrinfreies Suprarenin in Gestalt der Acetylverbindung der Analyse zu unterziehen, sowie auch die quantitativen Versuche auf die oben beschriebenen Suprarenin-Eisenverbindungen auszudehnen.

Strassburg i. Els., Dezember 1899.

1) Die sehr concentrirte (25 %ige) Lösung wurde mit sehr verdünntem Ammoniak unter sorgfältiger Vermeidung eines Ueberschusses gefällt, der Niederschlag auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen. Im Filtrate wurde die Trockensubstanz bestimmt.

Kommt in der Sepia-Schulpe Cellulose vor?

Von

Fr. N. Schulz.

(Aus dem physiologischen Institut zu Jena. [Chemische Abtheilung.])

(Der Redaction zugegangen am 1. Januar 1900.)

Ambronn¹⁾ hat die Meinung ausgesprochen, dass in den sogenannten Sepiaknochen neben dem Chitin eine Cellulose vorhanden sei. Er stützt sich hierbei einmal auf das Verhalten der durch Säure entkalkten organischen Stützsubstanz gegen Jod und Schwefelsäure, sowie gegen Chlorzinkjodlösung. Sodann macht er aber auch die Angabe, er habe durch Schweitzer'sches Reagens diese Cellulose isolirt. Beim Ansäuern des Kupferoxydammoniakauszugs mit Salzsäure «entstand ein feiner, langsam sich absetzender Niederschlag, der mit Chlorzinkjodlösung die charakteristische Violettfärbung ergab». Eine weitere Untersuchung dieses Niederschlages fand nicht statt.

Inzwischen haben die Untersuchungen von Krawkow²⁾ und von E. Zander³⁾ gezeigt, dass die erwähnten Farbenreactionen mit Jod für eine Anwesenheit von Cellulose neben Chitin nicht als beweisend angesehen werden können. Aber auch dem zweiten Stützpunkt Ambronn's für seine Ansicht konnten Krawkow sowohl wie Zander sich nicht anschliessen. Krawkow sagt nur: «Es ist uns nicht gelungen, die Cellulose in dem Chitin nachzuweisen, und sind wir demnach eher geneigt, an deren Vorhandensein bei den genannten Mollusken

¹⁾ Ambronn, Mittheil. aus d. zool. Station zu Neapel. Bd. IX, S. 475—478, 1890.

²⁾ N. P. Krawkow, Ueber verschiedenartige Chitine. Zeitschr. f. Biologie, N. F., Bd. 11, S. 177—198, 1892.

³⁾ E. Zander, Vergl. u. krit. Untersuch. z. Verständniss d. Jodreaction des Chitins. Pflüger's Archiv, Bd. 66, S. 545—573.

zu zweifeln.» Zander macht direkt die Angabe, dass es ihm nicht gelungen sei, mit Kupferoxydammoniak, «selbst unter den günstigsten Bedingungen,» Cellulose aus Sepiaknochen zu isoliren. «Ich zweifle nicht daran, dass Ambronn einen Niederschlag mit Salzsäure in dem Kupferoxydammoniak erhalten hat, glaube aber, dass dieser Niederschlag auf Verunreinigungen durch Cellulose zurückzuführen ist. Die Berührung mit Cellulose, wie Leinwand und Filtrirpapier, ist ja bei dem Reinigungsprocess des Chitins kaum zu vermeiden.»

Diese Erklärung der Angabe Ambronn's kann nicht als ausreichend betrachtet werden. Ambronn sagt an der betreffenden Stelle: «Die gewaschenen und getrockneten Schulpe wurden gepulvert, sodann entkalkt, mit frisch dargestelltem Kupferoxydammoniak extrahirt und die abfiltrirte Lösung mit Salzsäure ausgefällt.» Von einem Reinigungsprocess des Chitins ist also nicht die Rede und es ist nicht anzunehmen, dass bei den beschriebenen Manipulationen eine Verunreinigung mit Leinwand oder Filtrirpapier stattgefunden hat, da eine Filtration unnöthig und wegen der bestehenden Gefahr auch sicher unterlassen worden ist. Auch ist der durch Salzsäure erzeugte Niederschlag offenbar nicht unbedeutend gewesen, da Ambronn empfiehlt, «grössere Mengen der thierischen «Cellulose» darzustellen und eine eingehendere chemische Untersuchung dieses Körpers vorzunehmen».

Durch Herrn Prof. Biedermann auf diesen Widerspruch aufmerksam gemacht, habe ich es versucht, eine Aufklärung für denselben zu finden.

Zur Untersuchung gelangten gewöhnliche käufliche *ossa sepiae* (von Merck bezogen). An denselben lassen sich mechanisch zwei Schichten scheiden: eine harte, spröde Schicht, welche die Matrix der Schulpe darstellt, und eine weiche, poröse Schicht, in der bekannten, äusserst zierlichen, zelligen Structur. Beide Theile enthalten neben einer organischen Grundsubstanz grosse Mengen von anorganischen Salzen und zwar vorwiegend kohlensauren Kalk. In Bezug auf die organische Grundsubstanz verhalten sich die beiden Theile der Sepia-Schulpe verschieden. Beiden Theilen gemeinsam ist, wie schon längst bekannt, eine

reichliche Menge von Chitin, das bei Säurespaltung Glykosamin liefert. Die Chitinmenge ist so reichlich, dass Krukenberg¹⁾ die Sepia-Rückenschilder als am besten geeignet zur Reindarstellung des Chitins empfiehlt.

Während aber der weiche, poröse Theil als organische Grundsubstanz anscheinend ausschliesslich Chitin enthält, weist der harte, die Matrix darstellende Theil neben dem Chitin grosse Mengen von Eiweiss auf. Behandelt man den harten Theil der Schuppe nach dem Entkalken mit Salzsäure mit verdünnter Natronlauge, so gehen grosse Mengen von Eiweiss in Lösung, was schon aus der starken Biuretreaction ersichtlich ist, welche dieser Auszug gibt. Durch Neutralisation mit Salzsäure wird ein Niederschlag hervorgerufen, welcher sich im Ueberschuss von Salzsäure nur zum Theil auflöst.

Dieser Niederschlag gibt die gewöhnlichen Eiweissreactionen, Biuret, Millon, Xanthoproteinsäure, Adamkiewicz.

Dieses Eiweiss ist ursprünglich nicht in dieser in Alkali löslichen Form vorhanden, sondern anscheinend an irgend einen anderen Complex gebunden, aus welcher Bindung es durch die beim Entkalken angewandte Säure frei gemacht wird. Dies geht daraus hervor, dass durch direkte Extraction ohne vorheriges Entkalken mit Säure, auch wenn man aufs Feinste pulverisirt hat, sich nur Spuren von Eiweiss extrahiren lassen. Das durch die Säure frei gemachte Eiweiss ist in Säure völlig unlöslich, denn die beim Entkalken angewandte Säure gibt keine Biuretreaction.²⁾

Das durch die Säure frei gemachte Eiweiss wird durch die Einwirkung der Natronlauge sehr leicht verändert. Lässt man die Natronlauge (1—2%) nur kurze Zeit einwirken, so ist der beim Neutralisiren entstehende Niederschlag im Ueberschuss von Salzsäure so gut wie unlöslich. Je länger man die Lauge einwirken lässt, desto geringer ist der in Säure unlösliche Antheil, bis er schliesslich ganz verschwindet, namentlich beim Einwirken heisser Natronlauge. Der Neutralisations-

1) Vergl. physiol. Vorträge, Bd. I, S. 200, 1886.

2) Bei der Biuretprobe muss natürlich von dem durch Alkalizusatz ausgefällten Calciumoxyd abfiltrirt werden.

niederschlag bleibt jedoch auch bei längster Einwirkung der Natronlauge bestehen. Das, sei es durch Neutralisation, sei es durch Säureüberschuss, gefällte Eiweiss zeigt grosse Neigung zum Verquellen, so dass sich der Isolirung durch Filtration und dem Auswaschen auch durch Decantation grosse Schwierigkeiten entgegenstellen.

Das Eiweiss lässt sich jedoch leicht in Form einer Kupferverbindung gewinnen. Setzt man zu der alkalischen Lösung des Eiweisses Kupferoxyd hinzu und neutralisirt nunmehr mit Salzsäure, so erhält man einen feinen, blaugrünen Neutralisationsniederschlag, der sich leicht abfiltriren, auswaschen und trocknen lässt. Der Niederschlag zeichnete sich durch einen ausserordentlich hohen Kupfergehalt aus, der bis zu 20% betrug.¹⁾ Es kommt also diesem Eiweiss ein sehr hohes Basenbindungsvermögen zu, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass dasselbe ursprünglich in gebundener Form vorhanden war.

Der Kupferniederschlag stellt nichts Einheitliches dar, sondern ein Gemenge, denn es ergaben sich keine constanten Werthe für den Kupfergehalt.

Durch einen Ueberschuss von Salzsäure wird das Eiweiss wieder frei und es wird dadurch wieder in einen in Säure löslichen und einen unlöslichen Antheil getrennt.

Gegenüber Ammoniak verhält sich das Eiweiss der Sepia-Schulpe ganz analog. Auch im Schweitzer'schen Reagens ist es naturgemäss löslich, und aus dieser Lösung durch Neutralisation mit Salzsäure als Kupferverbindung fällbar. Beim Zerlegen mit Salzsäure im Ueberschuss bleibt ebenfalls ein Theil des Eiweisses ungelöst, der also wohl im Stande ist, Cellulose vorzutauschen.

In dem weichen Theil der Sepia-Schulpe lässt sich von diesem Eiweiss nichts nachweisen.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich die Erklärung des Widerspruchs zwischen der Angabe von Ambronn einerseits und von Krawkow und Zander andererseits. Man erhält in

¹⁾ Die von Harnack untersuchten, aus gewöhnlichem Eiweiss dargestellten Kupferalbuminate enthielten 1,3% und 2,6% Cu. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. V. S. 198.

der That durch Uebersäuren des Kupferoxydammoniakauszugs der ganzen Schulpe einen Niederschlag, der jedoch nicht Cellulose, sondern Eiweiss ist.

Ambrohn gibt an, dass dieser Niederschlag sich mit Chlorzinkjod violett färbt, und findet darin seine Hauptstütze für die Annahme des Vorkommens von Cellulose. In der That kann man beim Anstellen dieser Probe mit dem fraglichen Niederschlag violett schimmernde Färbungen erhalten, für gewöhnlich nimmt derselbe jedoch die braune Färbung der Jodeiweissverbindungen an.

Der Niederschlag besteht aber auch nicht aus einem Gemenge von Eiweiss und Cellulose. Denn erstens kann man aus dem mit verdünnter Natronlauge bis zum Verschwinden der Biuretreaction extrahirten, entkalkten, harten Theil der Schulpe durch nachträgliche Extraction mit Schweitzer'schem Reagens keinen in Säure unlöslichen Theil mehr in Lösung bringen. Zweitens ist der beim direkten Extrahiren mit Schweitzer'schem Reagens erhaltene säureunlösliche Niederschlag in den geringsten Spuren von Natronlauge vollständig löslich. Drittens hat der ziemlich überflüssige Versuch, durch Säurespaltung reducirenden Zucker aus dem fraglichen Niederschlag zu erhalten, ein völlig negatives Ergebniss.

Dass Krawkow und Zander diesen säureunlöslichen Niederschlag nicht erhielten, kann einmal daran gelegen haben, dass der harte Theil der Schulpe nicht mit zur Extraction kam.¹⁾ Sodann ist aber auch zu berücksichtigen, dass durch Einwirkung des Alkali das Eiweiss vollständig in die säurelösliche Form umgewandelt werden kann.

Das angenommene Vorkommen von Cellulose bei Mollusken ist also auf einen Irrthum zurückzuführen.

Jena, den 31. December 1899.

¹⁾ Die Extractionsbedingungen sind für den harten, compacten Theil ungünstig, so dass man feinstens zerkleinern und gründlich extrahiren muss.

Ueber die Reduction des Cholesterins zu Koprosterin im menschlichen Darmkanal.

Von

Dr. Paul Müller,
Assistent am Institut.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Graz.)

(Der Redaction zugegangen am 2. Januar 1900.)

Unter dem Namen «Koprosterin» hat Bondzynski¹⁾ zuerst einen cholesterinartigen Körper beschrieben, welcher einen regelmässigen Bestandtheil der normalen menschlichen Faeces bildet, und welcher, wie weitere im Verein mit Humnicki²⁾ angestellte Untersuchungen ergaben, als ein Reduktionsprodukt des Cholesterins, nämlich als ein Dihydrocholesterin angesprochen werden muss. Dasselbe unterscheidet sich in einigen nicht unwesentlichen Punkten von seiner Muttersubstanz: es krystallisirt in langen feinen Nadeln, ist, im Gegensatz zum Cholesterin, leicht löslich in kaltem absoluten Alkohol, seine Lösung ist rechtsdrehend. $([\alpha]_D = +24^\circ)$. Die gewöhnlichen Farbreactionen des Cholesterins zeigt der neue Körper zwar, aber mit einigen geringen Abweichungen. Ferner besitzt derselbe nicht, wie das Cholesterin, die Fähigkeit, Brom oder Jod zu addiren, und schmilzt schon bei 95—96°, während der Schmelzpunkt des Cholesterins bekanntlich bei 145° liegt.

Inwieweit dieser neue Körper mit dem von Flint schon in den sechziger Jahren beschriebenen Stercorin identisch ist, wollen wir hier nicht untersuchen und verweisen diesbezüglich auf die in dieser Zeitschrift geführte Controverse der Autoren. Jedenfalls geht aus Flint's erster Beschreibung seines Stercorins soviel hervor, dass es sich um einen, die Farbreactionen des Cholesterins darbietenden Körper handelte, der,

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1896, S. 478.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII.

wie das Koprosterin, aus einer öligen Mutterlauge langsam in feinen Nadeln auskrystallisirt, und dessen Schmelzpunkt weit niedriger liegt, als der des Cholesterins.

Aus der Thatsache nun, dass das Koprosterin nur im menschlichen Koth, nicht aber in der Galle und anderen normalen und pathologischen Körperflüssigkeiten und ebenso wenig in den Organen und Geweben zu finden ist, welche vielmehr nur Cholesterin enthalten, folgerten Bondzynski und Humnicki mit Recht, dass die Umwandlung des letzteren zu Koprosterin aller Wahrscheinlichkeit nach im Darmkanal vor sich gehen dürfte. In der That gelang es ihnen auch, zu zeigen, dass per os eingeführtes Cholesterin den menschlichen Körper zum grössten Theil nicht als solches, sondern als Koprosterin wieder verlässt, also während seines Durchgangs durch den Darmtract einem Reductionsprozess unterliegt, welcher zur Anlagerung von 2 Wasserstoffatomen führt.

Es ist nun gewiss ausserordentlich naheliegend, diese Veränderung des Cholesterins in direkte Beziehung zu den Processen der Eiweissfäulniss im Darne zu bringen, bei welchen ja auch Reductionsvorgänge eine grosse Rolle spielen, wie das Auftreten von Methan, Wasserstoff, Schwefelwasserstoff etc. beweist. Da jedoch der Versuch, das Cholesterin in vitro durch Fäulniss in Koprosterin überzuführen, nicht von Erfolg begleitet war, und andere Gründe für ihre Annahme von den Autoren nicht beigebracht werden, so kann derselben doch nur der Werth einer — wenn auch sehr plausiblen — Hypothese beigemessen werden, und es erscheint demnach berechtigt, sich nach entscheidenden Beweisen für oder gegen dieselbe umzusehen.

Es ist dies um so nothwendiger, als Flint,¹⁾ der die Umwandlung des Cholesterins in Stercorin ebenfalls im Darmkanal vor sich gehen lässt, gleichwohl zu einer anderen Auffassung der Ursachen dieses Processes gelangt ist. Da er nämlich fand, dass der Koth gesunder Menschen stets nur Stercorin enthalte, während sich im Meconium wie im Koth

¹⁾ Americ. Journ. of med. Sc. N. S. LXXXVIII (Referat). — Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIII. — New-York Medical Journal 1897.

von hungernden (im Winterschlaf gelegenen) Thieren stets Cholesterin vorfindet, so nahm er an, «dass diese Veränderung auf den Processen der Darmverdauung beruht», also ein Resultat der physiologischen Thätigkeit der Darmschleimhaut sei, welche im Hungerzustand pausire.

Es ist nun nicht schwer, die Entscheidung zwischen diesen beiden Annahmen zu treffen. Sind es thatsächlich, wie Bondzynski und Humnicki glauben, die Processe der Darmfäulniss, welche die Umwandlung des Cholesterins in Koprosterin veranlassen, so muss die letztere nothwendiger Weise ausbleiben, wenn durch irgend welche Umstände die Darmfäulniss aufgehoben, oder wenigstens auf ein Minimum reducirt wird, und es muss dann das unveränderte Cholesterin durch die Faeces zur Ausscheidung gelangen.

Nun ist bekanntlich eines der wirksamsten Mittel, die Eiweissfäulniss im Darne einzuschränken, die absolute Milchdiät. Senator und Baginski haben schon vor mehr als 20 Jahren darauf hingewiesen, dass in den Stühlen von Kindern, die mehrere Tage bis Wochen alt sind, weder Indol noch Phenol nachgewiesen werden kann, und ebenso bekannt ist es, dass die Ausscheidung der Aetherschwefelsäuren im Harn beim Erwachsenen durch reine Milchkost sehr erheblich herabgedrückt wird, beides Thatsachen, die sich durch eine Hemmung der Fäulnissprocesse im Darne erklären.

Um daher über die oben aufgeworfene Frage nach dem Einfluss der Darmfäulniss auf die Koprosterinbildung Aufschluss zu erlangen, war es nur nothwendig, den Milchkoth daraufhin zu untersuchen, ob derselbe unverändertes Cholesterin, oder dessen Reductionsprodukt, das Koprosterin, enthalte. War das erstere der Fall, dann war die Richtigkeit der von Bondzynski und Humnicki gemachten Annahme so gut wie erwiesen, während gleichzeitig die Flint'sche Erklärung als unzureichend fallen gelassen werden musste, da sie nicht im Stande ist, anzugeben, warum trotz der kräftigen Verdauungsthätigkeit der Darmschleimhaut, die sich nach Aufnahme von Milch, wie von jedem anderen Nahrungsmittel zweifellos einstellt, Cholesterin im Kothe vorhanden sein sollte.,

Ich habe nun eine Reihe von Milchkothen, die theils von Säuglingen, theils von Erwachsenen herrührten, auf die Anwesenheit von Cholesterin (bezw. Koprosterin) geprüft und habe zum Vergleiche auch Fleischkoth und Koth von gemischter Nahrung mit in die Untersuchung einbezogen.

Es war zwar schon nach den Angaben älterer Autoren, wie Uffelmann,¹⁾ Wegscheider,²⁾ Zweifel³⁾ u. A., nach welchen aus Säuglingsfaeces und aus Meconium regelmässig rhombische Krystalltafeln dargestellt werden können, welche die bekannten Farbreactionen mit concentrirter Schwefelsäure resp. mit Jod und Schwefelsäure geben, sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um Cholesterin und nicht um dessen Reductionsprodukt gehandelt hatte. Da jedoch diese Angaben sämmtlich aus einer Zeit herstammen, zu welcher man auch im Kothe des Erwachsenen nur Cholesterin gefunden haben wollte, während man eine Umwandlung desselben im Darmkanal als durchaus irrig abweisen zu müssen glaubte, und da ferner Schmelzpunktbestimmungen an dem cholesterinähnlichen Körper der Säuglingsfaeces, soweit ich finden konnte, nicht ausgeführt waren, so schien es mir, mit Rücksicht auf unsere Frage, nicht überflüssig, diese Lücke auszufüllen und so die Identität desselben mit Cholesterin sicher zu stellen.

Ueber das diesbezügliche Verhalten des Milchkothes vom Erwachsenen konnte ich Angaben in der Litteratur überhaupt nicht auffinden.

Zur Isolirung des Cholesterins resp. Koprosterins bediente ich mich mit gutem Erfolg der jüngst von C. Virchow⁴⁾ empfohlenen Methode, bei deren genauer Einhaltung es in der That leicht gelingt, die sonst so lästigen Aetheremulsionen gänzlich zu vermeiden.

50 g Fett (bezw. Aetherextract der Faeces) werden mit einer Mischung von 20 g Aetzkali, 50 g absolutem Alkohol und 20 ccm. Wasser in einem Kölbchen mit aufgesetztem Trichter

1) Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 28.

2) Ueber die normale Verdauung bei Säuglingen, Berlin, 1875.

3) Archiv f. Gynäkol., Bd. VII.

4) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genussmittel, 1899, Nr. 7.

25 Minuten lang auf dem Wasserbade verseift, auf 40° abgekühlt, mit 300 ccm. Wasser versetzt und nach dem völligen Erkalten dreimal mit je 500 ccm. Aether ausgeschüttelt. Die vereinigten Destillationsrückstände werden noch einmal mit 0,5 g Aetzkali 5 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt, auf 20 ccm. eingeengt, mit 30 ccm. Wasser versetzt und zweimal mit je 100 ccm. Aether extrahiert.

Das so erhaltene Produkt wurde stets zwei- bis dreimal aus heissem Alkohol umkrystallisiert, ehe es zur Schmelzpunktbestimmung verwendet wurde.

In Folge seiner leichten Löslichkeit in kaltem Alkohol scheidet sich das Koprosterin nur ziemlich langsam aus der alkoholischen Mutterlauge aus, während das Cholesterin schon in wenigen Minuten vollständig auskrystallisiert. Zugleich mit dem Koprosterin schied sich auch bei meinen Versuchen die von Bondzynski und Humnicki beschriebene ölige, dickflüssige, nicht krystallisierende Masse aus, die ich, wenn Cholesterin zugegen war, gewöhnlich vermisste. Nur in einem Falle (Nr. 7) war dieselbe reichlich vorhanden, und war vielleicht die Ursache davon, dass das Cholesterin hier längere Zeit als gewöhnlich zur Abscheidung brauchte; nachdem dasselbe aber einmal von der Mutterlauge getrennt war, verhielt es sich beim weiteren Reinigen vollkommen typisch.

Die Ergebnisse meiner Versuche sind in der beiliegenden kleinen Tabelle (Seite 134) zusammengestellt.

Wie aus derselben hervorgeht, konnte aus Milchkoth, gleichgiltig ob er vom Säugling oder vom Erwachsenen herrührte, stets unverändertes Cholesterin gewonnen werden, während Fleischkoth und Kothe von gemischter Nahrung nur Koprosterin enthielt. Bei der mikroskopischen Untersuchung der ersten Mutterlaugen fanden sich in Fall 1—6 stets nur die typischen Cholesterintafeln; in Fall 7 waren ausserdem noch spärliche nadelförmige Krystalle zu sehen, welche jedoch gegenüber den sehr reichlich vorhandenen Cholesterinkrystallen ganz in den Hintergrund traten. Mit Rücksicht darauf, dass diese Nadeln stellenweise zu charakteristischen Büscheln gruppiert waren, ist es nicht unwahrscheinlich, dass dieselben aus

Nr.	Koth	Schmelzpunkt	Aussehen	
1.	Brustkind	2 Mal umkrystallisirt, 144—145,5° 3 „ „ 145°	perlmutterglänzende rhomb. Plättchen	Cholesterin
2.	Flaschenkind	2 „ „ 144,5° 3 „ „ 145—145,5°	„	„
3.	Flaschenkind	2 „ „ 144,5—145,5°	„	„
4.	Meconium	3 „ „ 143°	„	„
5.	Saugkalb	2 „ „ 145—146°	„	„
6.	Milchkoth von Er- wachsenen (3 Tage je 3 l.)	2 „ „ 143,5° 3 „ „ 144,5—145°	„	„
7.	Milchkoth von Er- wachsenen (2 Tage je 6 ½ l.)	2 „ „ 143° 3 „ „ 144°	„	„
8.	Fleischkoth von Erwachsenen	3 „ „ 95,5—96°	feine, büschelförmig angeordnete Nadeln	Koprosterin
9.	Koth von gemischter Kost Erwachsener	2 „ „ 96—96,5°	„	„

Koprosterin bestanden. Es braucht wohl kaum gesagt zu werden, dass dieser Befund durchaus nicht geeignet ist, die von Bondzynski und Humnicki ausgesprochene Hypothese, die, wie man sieht, durch unsere Versuche eine vollständige Bestätigung erfährt, irgendwie zu entkräften. Ist es ja doch bekannt, dass durch die absolute Milchdiät beim Erwachsenen die Prozesse der Darmfäulniss zwar sehr bedeutend eingeschränkt, aber niemals vollständig aufgehoben werden können, wie ja auch die Aetherschweifelsäuren im Harn durch

dieselbe nie gänzlich zum Verschwinden zu bringen sind. Es kann daher nicht Wunder nehmen, wenn dem entsprechend auch bei mehrtägiger Milchkost ein kleiner Bruchtheil des Cholesterins der Reduction zu Koprosterin unterliegt, während die Hauptmasse desselben unverändert durch die Faeces ausgeschieden wird. Wie gross dieser Bruchtheil ausfällt, dies mag von verschiedenen, nicht immer klar zu übersehenden und auch nicht immer in demselben Sinne einwirkenden Nebenumständen, wie von der Menge der aufgenommenen Milch, von der Menge des vorhandenen Cholesterins, von der Zeit, welche dasselbe im Darmkanale verweilt, von dem jeweiligen Zustande des letzteren u. s. w. abhängen; so ist es auch nicht ausgeschlossen, dass unter gewissen Bedingungen trotz Milchdiät die Fäulnisprocesse im Darminhalt stark genug bleiben könnten, um sämtliches Cholesterin zu reducirern. Es scheint dies wenigstens in einem von mir untersuchten Falle eingetreten zu sein, bei welchem sich kurz nach Beginn des Milchgenusses leichte Verdauungsstörung einstellte, und bei welchem im (übrigens sehr undeutlich abgegrenzten) Kothe kein Cholesterin gefunden wurde. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass dabei auch die kurze Zeitdauer des Versuches — es handelte sich um eine nur eintägige Milchperiode — eine Rolle gespielt hat, indem dieselbe vielleicht nicht ausreichend war, um eine durchgreifende Aenderung in der Bacterienflora des Darmes und damit in den chemischen Umsetzungen, die sich daselbst abspielen, hervorzurufen.

Dass im Meconium, wie auch Flint fand, nur Cholesterin gefunden wird, ist bei dem Fehlen der bacteriellen Zersetzungen im fötalen Darmkanal nur eine ganz selbstverständliche Folgerung der in Rede stehenden Hypothese.

Zum Schlusse erlaube ich mir, Herrn Prof. Prausnitz für das stete fördernde Interesse, das er dieser Arbeit zutheil werden liess, meinen besten Dank auszusprechen.

Graz, den 29. December 1899.

Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül.

II. Mittheilung.

Von

cand. med. **Walther Hausmann** (aus Meran).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 25.)

(Der Redaction zugegangen am 5. Januar 1900.)

I.

Vor einiger Zeit habe ich über Untersuchungen berichtet,¹⁾ welche den Zweck verfolgten, eine vorläufige Vorstellung über die Bindungsweise des Stickstoffs in den thierischen Proteinkörpern zu gewinnen, und zwar bestimmte ich nach Zerlegung mit Salzsäure neben dem Gesamtstickstoff 1. den in Form von Ammoniak abgespaltenen Stickstoff, 2. den Stickstoff der basischen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen und 3. den festgebundenen, aber nicht basischen Spaltungsprodukten angehörigen Stickstoff.

Der Kürze wegen habe ich, unserer augenblicklichen Kenntniss der Eiweisskörper entsprechend, diese verschiedenen Arten des Eiweisstickstoffs als: Amid-, Diamino-, Monaminostickstoff bezeichnet. Damit sollte natürlich der Frage, ob sich nicht noch andere Bindungsformen des Stickstoffs im Eiweiss vertreten finden, nicht vorgegriffen werden.

Es ergaben sich nun bei Untersuchung verschiedener Eiweisskörper so grosse Differenzen in der Vertheilung des Stickstoffs, dass es wünschenswerth erschien, noch andere, namentlich in reiner Form erhältliche Eiweisskörper der Untersuchung in gleicher Richtung zu unterziehen. Ich habe deshalb auf Veranlassung von Herrn Professor Hofmeister die

1) Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95.

Bindungsweise des Stickstoffs in einigen weiteren Proteinkörpern bestimmt.

Es gelangten zur Untersuchung krystallisirtes Oxyhämoglobin (vom Pferde), Globin (vom Pferde) und krystallisirtes Edestin (aus Hanfsamen).

Zur Untersuchung des Oxyhämoglobins stand mir ein nach Hoppe-Seyler dargestelltes Präparat zur Verfügung.

Das Globin wurde nach F. N. Schulz¹⁾ dargestellt. Als Ausgangsmaterial zur Darstellung des Globins benutzte ich ein nach dem Verfahren von Micko²⁾ hergestelltes Präparat.³⁾ Nach diesem Verfahren gelingt es leicht, schön krystallisirtes Oxy- bzw. Methämoglobin in grosser Menge zu gewinnen und beliebig oft umzukrystallisiren. Den abfiltrirten Krystallen haftet aber noch salzhaltige Mutterlauge an, welche, wie Schulz hervorhebt, die Trennung des Globins vom abgespaltenen Hämatin verhindert. Ich löste daher die abgepressten Krystalle in wenig Wasser, wenn nöthig unter Zusatz einer Spur von Ammoniak, und dialysirte gegen viel destillirtes Wasser, welches mehrmals gewechselt wurde. Die salzarme, im Dialysirschlauche verbliebene Lösung wurde filtrirt und konnte dann genau nach Schulz auf Globin verarbeitet werden. Die Globinlösung wurde mit Ammoniak und Chlorammonium versetzt, der entstandene Niederschlag einige Male durch Decantiren gewaschen, sodann mit Alkohol in der Hitze coagulirt und auf dem Seidenfilter gewaschen, bis das Filtrat keine Ammoniakreaction mit Nessler's Reagens mehr gab.

Krystallisirtes Edestin aus Hanfsamen wurde nach der bei Griessmayer⁴⁾ angegebenen Methode dargestellt. Gemahlene, mit Benzin extrahirte Hanfsamen wurden in 10%iger Kochsalzlösung aufgenommen, filtrirt und gegen destillirtes Wasser dialysirt. Nach kurzem Stehen schieden sich reich-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449.

2) Vergl. Spiro, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 182.

3) Ich verdanke dasselbe der Freundlichkeit des Herrn Dr. Fuld.

4) Griessmayer, Die Proteide der Getreidearten u. s. w., 1897, S. 271.

lich oktaedrische, schön ausgebildete Krystalle aus. In die aus dem Dialysirschlauch entleerte krystallführende Flüssigkeit wurde festes Kochsalz eingetragen, bis der Niederschlag sich löste. Die filtrirte Flüssigkeit wurde abermals gegen destillirtes Wasser dialysirt. Das Edestin schied sich frei von amorphen Beimengungen schön krystallisirt aus. Die Stickstoffbestimmung des trockenen, nicht bis zur völligen Chlorfreiheit gewaschenen Präparates ergab nach Kjeldahl untersucht 18,62% und 18,44%, im Mittel 18,53% Stickstoff, in guter Uebereinstimmung mit Ritthausen's und Osborne's Analysen.

II. Zur Versuchsanordnung.

Wie schon früher bemerkt, ist die von mir angewandte Versuchsanordnung zwar nicht ausreichend, um so exacte Zahlen zu liefern, wie man es von der Analyse anorganischer Stoffe zu verlangen gewohnt ist, doch genügt sie, wie ich mich jetzt neuerdings überzeugt habe, die quantitativen Verschiedenheiten in der Stickstoffbindung der Eiweisskörper sicher erkennen zu lassen. Ich habe sie daher im Wesentlichen beibehalten und möchte nur auf einige einschlägige Punkte näher eingehen.

Obgleich für Monamino-säuren allgemein angenommen ist, dass sie durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden, habe ich, wohl zum Ueberfluss, um neuerdings auftauchende Zweifel auf ihre Richtigkeit zu prüfen, die mir zugänglichen Aminosäuren, namentlich auch Phenylalanin und Aminovaleriansäure, in verdünnter saurer Lösung auf ihre Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure untersucht, aber nur negative Resultate erhalten. Hingegen wird Guanidin in saurer Lösung gefällt, sein Stickstoff somit auch in dem an sich unwahrscheinlichen Falle, dass Guanidin durch Säure aus dem Arginincomplexe abgespalten wird, mit dem Stickstoff der Diaminoverbindungen zusammen bestimmt.

Ich habe weiter, um mich zu unterrichten, ob die quantitative Ausfällung der Diamino-säuren mit Phosphorwolframsäure aus der durch Destillation mit Magnesia vom Amidstick-

stoff befreiten salzsauren Zerkochungsflüssigkeit von der Concentration der letzteren merklich beeinflusst werde, Parallelversuche in der Art angestellt, dass ich die Ausfällung 1) aus sehr concentrirter, 2) aus der auf das doppelte Volumen verdünnten Lösung vornahm. Ich habe dabei einen Einfluss der verschiedenen Concentration nicht beobachtet.

Was die Zersetzung des Niederschlages der Diaminosäuren und der Aminosäurenlösung mit Kjeldahl-Schwefelsäure betrifft, so ist die früher befolgte Art des Zusatzes von Permanganat insofern geändert worden, als ich zur ursprünglichen Angabe von Kjeldahl (nämlich Erhitzen bis zur Schwärzung, Abkühlenlassen, Zusatz von Permanganat, sodann weiteres Erhitzen) zurückgekehrt bin.

Da die Permanganatoxydation bei einzelnen Substanzen zu kleinen Stickstoffverlusten führt, habe ich mich vergewissert, dass meine Bestimmungen diesem Fehler nicht unterliegen. Gleiche Volumina derselben Flüssigkeit wurden einerseits mit Hülfe von Permanganat, andererseits unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kupfersulfat zersetzt. Ein Unterschied in den Resultaten konnte in diesen Parallelversuchen nicht nachgewiesen werden; nur erwies sich bei Anwesenheit von viel Phosphorwolframsäure die Zersetzung mit Kaliumsulfat und Kupfersulfat als rascher und bequemer ausführbar, so dass ich sie von da ab bevorzugte.

Bezüglich der Spaltung des Hämoglobins mit concentrirter Salzsäure sei noch Folgendes bemerkt. Bei mehrstündigem Kochen des Oxy- resp. Methämoglobins mit concentrirter Salzsäure scheidet sich ein schwarzer Niederschlag aus, der, wie die mikroskopische Untersuchung lehrt, aus gänzlich undurchsichtigen, ziemlich grossen, kugeligen Körnern besteht. Der völlig ausgewaschene Niederschlag ist löslich in Alkali, in Ammoniak, in starker Essigsäure, in säurehaltigem Aethylalkohol und Methylalkohol, nicht in verdünnter Essigsäure, Aceton und Amylalkohol. In concentrirter Schwefelsäure löst er sich mit braunrother Farbe. Bei Reduction mit Zinn und verdünnter Schwefelsäure wird er entfärbt. Das Spectrum der alkalischen Lösung zeigt vier Absorptionsstreifen, die am meisten

jenen des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung entsprechen, wie denn überhaupt die Eigenschaften des Körpers, z. B. der Farbenwechsel bei Behandlung mit warmer Salpetersäure und die Lösungsverhältnisse, denen des Hämatoporphyrins nahe stehen.

Auf die genauere Untersuchung dieses Hämatinabkömmlings habe ich vorläufig verzichten müssen. Bemerkt sei aber, dass er zweifellos mit merklichen Mengen des bei der Säureeinwirkung aus der chromogenen Gruppe des Eiweisses entstehenden melaninartigen Pigments verunreinigt war. Bei Weiterführung der Versuche ergab sich nämlich, dass bei Spaltung des Globins mit Salzsäure ebenfalls ein schwarzer Körper, Schmiedeberg's Melanoidinsäure entsprechend, in relativ grosser Menge gebildet wird, welcher von dem Hämatinabkömmling in seinen Eigenschaften verschieden, aber von ihm doch nicht leicht zu trennen ist.

Ich habe beim Hämoglobin den Stickstoffgehalt des Hämatinderivates gesondert bestimmt, indem ich nach der Destillation der salzsauren Zerkochungsflüssigkeit mit Magnesia, den Niederschlag auf Filtern sammelte, wusch und Filter sammt Niederschlag nach Kjeldahl verarbeitete. (Der in mehreren Parallelversuchen bestimmte Stickstoffgehalt des Filters lag innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen.)

In den Uebersichtstabellen habe ich, um weitere Columnen zu vermeiden, die Stickstoffwerthe des Farbstoffes in die Columne der Diaminosäuren, wenn auch getrennt von diesen, eingereiht. Nach dem Gesagten dürften die für den Hämatinstickstoff erhaltenen Zahlen etwas zu hoch, die für den Diaminostickstoff gefundenen entsprechend zu niedrig ausgefallen sein. Doch ist sicherlich der Fehler nicht erheblich, da die Menge des aus der chromogenen Gruppe des Eiweisses durch Salzsäure erhältlichen Melanins in der Regel nur 1—2% beträgt.

III.

Die Resultate meiner Versuche theile ich nachstehend tabellarisch mit.

A. Bestimmung des Amidstickstoffs.

Tabelle I.

	Gewicht der Probe	N des mit MgO abdestillierten NH ₃	Amid-N in %	
				Mittel
Krystallisirtes Hämoglobin	0,7720	0,0085	1,10	1,07
	0,6308	0,0066	1,05	
Globin	0,7725	0,0063	0,82	0,78
	0,8735	0,0066	0,75	
Krystallisirtes Edestin	0,8886	0,0175	1,97	1,90
	0,9582	0,0175	1,83	

B. Bestimmung des Stickstoffs des bei der Spaltung von Hämoglobin entstehenden schwarzen Körpers.

Tabelle II.

Gewicht der Probe	Gefunden N		
	direkt	in %	Mittel
0,7720	0,0054	0,71	0,72
0,6308	0,0046	0,73	

C. Bestimmung des Diaminostickstoffs.

Tabelle III.

	Gewicht der Probe	Volumen der Lösung des Phosphor- wolfram- säurenieder- schlages	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theiles	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	0,7720	210	60	0,0098	0,0343	4,44	4,07
	0,6308	226	60	0,0064	0,0241	3,82	
	0,6308	226	60	0,0066	0,0249	3,94	
Globin	0,8735	250	45	0,0079	0,0439	5,02	4,96
	0,7725	250	45	0,0068	0,0378	4,89	
	0,7725	250	45	0,0069	0,0383	4,96	
Krystallisirtes Edestin	0,9592	250	45	0,0118	0,0655	6,84	7,07
	0,9582	250	45	0,0126	0,0700	7,30	

D. Bestimmung des Monaminostickstoffes.

Tabelle IV.

	Gewicht der Probe	Volumen des Phosphor- wolfram- säure- filtrates	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theiles	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	0,7720	500	120	0,0209	0,0871	11,28	10,95
	1,3733	500	60	0,0175	0,1458	10,62	
Globin	0,8735	500	90	0,0171	0,0950	10,88	11,33
	0,7725	500	90	0,0164	0,0911	11,79	
Krystallisirtes Edestin	0,8886	500	45	0,0079	0,0877	9,88	10,19
	0,9582	500	90	0,0181	0,1005	10,49	

Tabelle V enthält die Zusammenstellung der gefundenen Mittelwerthe behufs Vergleich der sich aus diesen Summanden ergebenden Gesamtstickstoffwerthe mit den für den Gesamtstickstoff von den betreffenden Autoren gefundenen Zahlen.

Tabelle V.

	Amido- stickstoff	Diamino- stickstoff	Monamino- stickstoff	Summe	Stickstoffgehalt	
						nach
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	1,07	0,72 ¹⁾ 4,07	10,95	16,81	17,31	Hoppe-Seyler
Globin	0,78	4,96	11,33	17,07	16,89	Schulz
Krystallisirtes Edestin	1,90	7,07	10,19	19,16	18,53	eigener Analysen

Tabelle VI enthält eine Zusammenstellung der bisher über die Vertheilung des Stickstoffs bei den verschiedenen Eiweisskörpern ermittelten Daten in Procenten des Gesamtstickstoffs. Die Analysenzahlen vom Eiweisskörper der Coni-

1) Stickstoff des Hämatins.

ferensamen» rühren her von E. Schulze¹⁾, die der Proto- und Heteroalbumose von E. P. Pick.²⁾ Die Eiweisskörper sind angeordnet nach dem steigenden Gehalte von Diaminosäuren, so dass Casein die Reihe beginnt, ein Pflanzeneiweisskörper und Heteroalbumose dieselbe beschliessen.

Tabelle VI.

	Amid- stickstoff %	Diamino- stickstoff %	Monamino- stickstoff %	Stickstoff in Summe gefunden statt 100%
Casein	13,37	11,71	75,98	101,06
Krystallisiertes Eieralbumin	8,53	21,33	67,80	97,66
Krystallisiertes Oxyhämoglobin (Pferd)	6,18	4,16 ³⁾ 23,51	63,26	97,11
Serumglobulin (Pferd)	8,90	24,95	68,28	102,13
Protoalbumose des Fibrins	7,14	25,42	68,17	100,73
Globin (Pferd)	4,62	29,37	67,08	101,07
Eiweisskörper der Coniferensamen	10,3	32,8	56,90	—
Leim	1,61	35,83	62,56	—
Krystallisiertes Edestin	10,25	38,15	54,99	103,39
Heteroalbumose des Fibrins	6,45	38,93	57,40	102,78

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276 u. Bd. XXV, S. 360.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 258.

3) Stickstoff des Hämatins.

Im Hinblick auf voranstehende Tabelle ist es kaum nöthig, nochmals auf die grossen Unterschiede hinzuweisen, die nach den gefundenen Verschiedenheiten im constitutionellen Aufbau der einzelnen Proteinkörper bestehen müssen.

Ganz speciell betreffen diese Unterschiede die quantitativen Verhältnisse der basischen Spaltungsprodukte, und zwar machen sich hier die Abweichungen viel deutlicher bemerkbar, als bei den in viel grösserer Menge vorhandenen Monamino- säuren.

Beachtenswerth ist die Thatsache, dass die zwei bisher in Betreff ihrer Stickstoffbindung untersuchten pflanzlichen Eiweisskörper — E. Schulze's aus Coniferensamen dargestellter Proteinkörper und das krystallisirte Edestin aus Hanfsamen — einen sehr hohen Gehalt an basischem Stickstoff aufweisen. Es dürfte aber vorläufig noch nicht gestattet sein, hieraus zu schliessen, dass pflanzliche Eiweisskörper überhaupt reicher an basischen Gruppen sind. Die beim Globin, Leim und der Heteroalbumose des Fibrins, also bei Stoffen, welche den nativen thierischen Eiweisskörpern zum mindesten sehr nahe stehen, gefundenen Werthe lassen das Vorkommen von an basischen Gruppen reicheren Eiweissstoffen auch für den Thierkörper möglich scheinen.

Was die Zahlen für Oxyhämoglobin und Globin betrifft, so dürfte dem Obengesagten zu Folge dem Unterschied von 5,84 % im Diaminostickstoffe insofern nicht zu grosse Bedeutung beizumessen sein, als der dem Globin entstammende, wenn auch in geringer Menge erhältliche Stickstoff der Melanoidinsäure bei Untersuchung des Hämoglobins vom Niederschlage der Diaminosäuren getrennt und mit dem Hämatinabkömmling vereinigt bestimmt wurde, und ausserdem die Summanden beim Hämoglobin eine etwas zu niedrige, beim Globin eine zu hohe Zahl für den Gesamtstickstoff ergaben. Hingegen scheint die beim Hämoglobin und Globin sich ergebende Differenz im Amidstickstoff in Anbetracht der sonstigen grossen Schärfe der Bestimmung desselben trotz ihrer absoluten Kleinheit nicht unwichtig für die Beurtheilung der Entstehung des Globins aus dem Hämoglobin. Der Unterschied meiner

Amidstickstoffwerthe von denen Pröscher's¹⁾ dürfte sich ungezwungen daraus erklären, dass Pröscher nach der Zerkochung des Hämoglobins mit Salzsäure und Zinnchlorür das entstandene Ammoniak mit Kalilauge statt mit Magnesia austrieb, wobei eine nachträgliche Abspaltung von Ammoniak aus den gegen Säure beständigen Spaltungsprodukten des Eiweisses nicht ausgeschlossen ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 114.

Organische Phosphorverbindungen im Säuglingsharn, ihr Ursprung und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel.

Von

Dr. Arthur Keller, Assistent der Klinik.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik zu Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 9. Januar 1899.)

Die Thatsache, dass im Harn ein Theil des Phosphors nicht in Form von Phosphorsäure, sondern in organischer Bindung ausgeschieden wird, ist zwar seit den Arbeiten von Ronalds und von Klüpfel und Fehling bekannt; als derartige Phosphorverbindungen wurden auch bereits von Sotnitschewsky die Glycerinphosphorsäure und von Rockwood die Phosphorfleischsäure nachgewiesen, aber quantitative Bestimmungen der organischen und anorganischen Phosphorverbindungen im Harn liegen aus älterer Zeit nur vereinzelt, so von Lepine und Eymonnet, Zuelzer und Chapelle vor.

In neuerer Zeit wendet sich diesen Fragen erhöhtes Interesse zu, da mannichfache Erfahrungen darauf hindeuten, dass den organischen Phosphorverbindungen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel zukommt. Aus Siegfried's Laboratorium stammt eine Arbeit von Oertel,¹⁾ der bei einer Anzahl anscheinend normaler erwachsener Menschen die Ausscheidung von Gesamtposphor und organischem Phosphor im Harn quantitativ bestimmte. Dabei wendet er folgende Methode an: 50 resp. 100 ccm. Harn wurden in Silberschalen abgedampft, mit Aetzkali und Salpeter geschmolzen, die salpetersaure Lösung der Schmelze mit molybdänsaurem Ammo-

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, 1898/99, S. 123.

niak gefällt und die Methode dann in der bekannten Weise weitergeführt bis zum Glühen und Wägen der pyrophosphorsauren Magnesia. In einer zweiten Portion Harn wurden die Phosphate mit Chlorcalcium in ammoniakalischer Lösung gefällt, abfiltrirt und gewaschen und im Filtrat der Phosphor wie oben bestimmt, das Ergebniss als organisch gebundener Phosphor angesprochen.

Nach Oertel's Untersuchungen werden 1,6—4,8% des Gesamtposphors in organischer Verbindung ausgeschieden, die absoluten Mengen des organischen Phosphors schwanken zwischen 0,12 und 0,03 g P_2O_5 . Das Verhältniss von organischem Phosphor zum Gesamt-Phosphor ist nicht nur bei verschiedenen Individuen verschieden, sondern ändert sich auch bei derselben Versuchsperson.

Bei drei Erwachsenen untersuchte Oertel den Einfluss der Arbeit auf die Ausscheidung organischen Phosphors und kam zu dem Resultat, dass ein derartiger Einfluss, wenigstens bei kurzdauernder Arbeit, nicht existirt. Diese Untersuchungen, bei denen er ausser dem Phosphor noch den Stickstoffgehalt des Harns bestimmte, führten ihn aber zu dem weiteren Schluss, dass die Grösse der Ausscheidung des organisch gebundenen Phosphors den Grössen des Stickstoffumsatzes parallel geht.

Wenn auch die Zahlen für das Verhältniss von N zu P_2O_5 im organisch gebundenen Phosphor thatsächlich nur innerhalb enger Grenzen von 100:0,3 bis 100:0,57 schwanken, so scheint mir doch der Schluss durch Beobachtung von nur drei Individuen nicht genügend gestützt. Auf die Schlussbemerkungen von Oertel komme ich an späterer Stelle zurück, jetzt will ich zunächst über meine eigenen Untersuchungen berichten.

Bei Gelegenheit von Stoffwechseluntersuchungen¹⁾ an Säuglingen ergaben sich auffallende Unterschiede in der Phosphorausscheidung beim Brustkind und beim künstlich genährten Kinde, und zwar wird von künstlich genährten Säug-

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Medicin, Bd. 36, 1898.

lingen erheblich mehr Phosphorsäure im Harn ausgeschieden, als von Brustkindern. Die Differenz ist so gross, dass sie deutlich genug erkennbar ist, auch wenn erhebliche Unterschiede in Betreff des Ernährungszustandes und des Alters der Kinder, der Menge der aufgenommenen Nahrung und des darin enthaltenen Phosphors bestehen; sie tritt aber um so deutlicher hervor, wenn wir Gelegenheit haben, an demselben Kinde den Einfluss verschiedener Ernährung auf die Ausscheidung von Phosphor zu untersuchen, wie ich dies bei drei Kindern ausgeführt habe.

Diese letzteren Kinder wurden zunächst mit Frauenmilch ernährt und erhielten in einer zweiten, ebenfalls mehrtägigen Periode Kuhmilch mit 2 Theilen Wasser verdünnt. Um vergleichbare Resultate zu haben, wurde den Kindern während beider Perioden täglich die gleiche Menge von Nahrung zugeessen. Ich möchte noch hervorheben, dass wenigstens bei zweien der Versuchskinder zwischen den beiden Perioden nur wenige Tage Zwischenraum waren und dass das Allgemeinbefinden der Kinder, soweit wir klinisch beobachten konnten, sich nicht geändert hatte.

Aus den Untersuchungen ergab sich, dass die Kinder bei Ernährung mit Frauenmilch bedeutend weniger Phosphorsäure im Harn ausschieden als bei Ernährung mit Kuhmilch. Da ich in diesen Fällen ausserdem die Menge der getrunkenen Nahrung kannte und so die Quantität des in der Nahrung eingeführten Phosphors wenigstens annähernd berechnen konnte, stellte sich die weitere Thatsache heraus, dass mit Kuhmilch die Unterschiede im Gehalt des Harns an Phosphorsäure beträchtlich grösser sind, als dem Gehalt der Nahrung an Phosphor entsprechen würde.

Aehnliche Unterschiede, wie sie die absoluten Zahlen der im Harn ausgeschiedenen Phosphorsäuremengen zeigen, treten hervor, wenn wir das Verhältniss P_2O_5 zu N im Harn bei Brustkindern und bei künstlich genährten Kindern berücksichtigen. Bei den ersteren war dasselbe im Durchschnitt 1:7, bei den letzteren etwa 1:2.

Wenn wir nun erwägen, dass das Verhältniss von P_2O_5

zu N in der Frauenmilch ungefähr 1:5,5, in der Kuhmilch 1:2,5 ist, so erscheint der Schluss gerechtfertigt, dass die Ausscheidung der Phosphorsäure nicht allein von der Quantität des in der Nahrung eingeführten Phosphors abhängig ist, sondern dass dabei noch andere Momente in Frage kommen. Da nun Frauenmilch und Kuhmilch sich nicht nur im Gehalt an Gesamtposphor, sondern namentlich an organischem Phosphor unterscheiden, so lag der Gedanke nahe, dass die Art der Bindung des Phosphors in der Nahrung auf die Ausnutzung und Ausscheidung desselben Einfluss hat.

Um der Entscheidung der berührten Fragen näher zu kommen, habe ich an gesunden und kranken Kindern des ersten Lebensjahres bei verschiedenartiger Ernährung Stoffwechseluntersuchungen in der Weise ausgeführt, dass in der Nahrung, im Harn und Koth Stickstoff und Phosphor bestimmt wurde.

Beim Phosphorstoffwechsel musste für mich die Bestimmung, in welcher Form der Phosphor im Harn ausgeschieden wird, von demselben Interesse sein, wie bei den Untersuchungen über Ausnutzung des Nahrungsstickstoffs nicht nur die Ausscheidung von Gesamtstickstoff im Harn, sondern auch die von Harnstickstoff Berücksichtigung findet.

Aus diesem Grunde habe ich neben dem Gesamtposphor gleichzeitig die Menge des im Harn ausgeschiedenen organischen Phosphors bestimmt.

Da unsere Kenntnisse betreffs der Ausscheidung organischer Phosphorverbindungen im Harn, wie aus der oben angeführten Litteratur hervorgeht, sehr mangelhaft sind, dürften meine Untersuchungen gleichzeitig für das Studium dieser speciellen Frage von Bedeutung sein.

Denn dadurch, dass ich nicht nur organischen und Gesamtposphor im Harn, sondern gleichzeitig Stickstoff und Phosphor in Nahrung und Koth bestimmte, hatte ich eine Reihe von Zahlen in der Hand, die für die Beurtheilung des Einflusses bestimmter Stoffwechselvorgänge auf die Ausscheidung organischen Phosphors im Harn von Wichtigkeit sind. Wenn in dieser Hinsicht schon die Ergebnisse meiner Untersuchungen

auch für die allgemeine Physiologie, nicht nur für die der Kinder Werth haben, so kommt noch dazu, dass Versuche an Kindern für die Entscheidung der in Rede stehenden Frage besonders geeignet sind. In den gebräuchlichsten Nahrungsmitteln für Säuglinge, in der Frauenmilch und in der Kuhmilch, haben wir erhebliche Gegensätze in Betreff des Phosphorgehalts. Die Kuhmilch enthält ungefähr 2,4 g P_2O_5 im Liter, davon sind 0,67 g organisch gebunden, während die Frauenmilch nur 0,47 g P_2O_5 im Liter enthält, von denen nur ein minimaler Theil aus organischen Salzen besteht. Ausser Frauenmilch und Kuhmilch in verschiedenen Verdünnungen habe ich noch bei Ernährung mit Malzsuppe und bei Zusatz von Natriumphosphat zur Frauenmilch Untersuchungen angestellt. Auch in anderer Beziehung waren die Versuchsanordnungen möglichst verschiedenartig: die Kinder gehörten verschiedenen Altersstufen des ersten Lebensjahres an, zwei davon waren gesunde, normal gedeihende Brustkinder, die andern litten an mehr oder weniger schweren Ernährungsstörungen, sodass namentlich unter dem Einfluss verschiedenartiger Ernährung auch grosse Differenzen in Betreff von Körpergewichtszunahme von N- und P_2O_5 -Ansatz und in Betreff der Menge der in Harn ausgeschiedenen Gesamtphosphorsäure zwischen den einzelnen Versuchen bestehen. Schliesslich möchte ich noch hervorheben, dass in mehreren Fällen Versuche an einem Kinde bei verschiedenartiger Ernährung ausgeführt wurden, Versuche, aus deren Ergebniss wir wohl am ehesten den Einfluss von Menge und Art der Nahrung auf die Ausscheidung organischen Phosphors ermassen können.

Betreffs der Versuchsanordnung, des Auffangens von Harn und Koth verweise ich auf die Angaben in meinen früheren Arbeiten ¹⁾ und auf die Arbeit von Freund. ²⁾ Ich möchte auch hier erwähnen, dass es bei unserer Methodik mit Sicherheit gelingt, die Excrete ohne Verlust aufzufangen. Was die Bestimmung des Gesamtphosphors in Nahrung und Koth

¹⁾ Centralblatt für innere Medicin, 1898, Nr. 21 und Jahrbuch für Kinderheilkunde, 44. Band, 1897, S. 25.

²⁾ Jahrbuch für Kinderheilkunde, 48. Band, 1898.

betrifft, habe ich die Methode von Neumann gewählt und zwar mit geringen Abweichungen, wie sie im Laboratorium von Herrn Professor Röhmann üblich sind, dem ich für seine lebenswürdigen Rathschläge betreffs der Untersuchungsmethodik auch an dieser Stelle besten Dank sage. Die Methode ist in den Arbeiten von Marcuse¹⁾ und von Steinitz²⁾ angegeben. Da ich in der Ausführung auf Rath von Herrn Professor Röhmann einige Aenderungen, die sich im Laboratorium bereits bewährt hatten, anwendete, will ich die Methode hier ausführlich angeben.

Eine gewogene Menge von Substanz, sei es Koth oder Milch oder auch Harn, wird im Kjeldahl-Kolben mit etwa 10 ccm. rauchender Salpetersäure langsam erhitzt, bis die braunen Nitrosodämpfe verschwunden sind, nach dem Abkühlen wurden von concentrirter Schwefelsäure etwa 10 ccm. zugesetzt und die Flüssigkeit wiederum erhitzt. Nach jedemaligem Abkühlen wurden 2—3 Portionen von Ammonnitrat (an Menge im Ganzen etwa soviel Gramm, wie Cubikcentimeter Schwefelsäure verwendet wurde) zugesetzt und die Flüssigkeit allmählich immer stärker erhitzt, zuletzt mit einem Dreibrenner. Stärkeres andauerndes Erhitzen habe ich, wenn es sich um grössere Mengen von Substanz handelte, vermieden, bevor nicht Ammonnitrat zugesetzt war, da vorher beim Erhitzen leicht starkes Stossen eintritt. Die nach dem Zusatz der Schwefelsäure unter dem Einfluss des Erwärmens schwarz gefärbte Flüssigkeit wird allmählich immer heller, die Verbrennung ist genügend weit durchgeführt, wenn die Flüssigkeit farblos ist. Man thut übrigens gut, nicht allzuviel Ammonnitrat (die nothwendige Menge kann man in jedem einzelnen Falle unter Beobachtung der allmählich sich vollziehenden Farbenveränderung abschätzen) zu verwenden oder die Flüssigkeit zu stark einzudampfen, da sonst beim Erkalten leicht das Salz ausgeschieden wird, welches oft dem Kjeldahl-Kolben fest anhaftet. Aus dem Kolben wird die Flüssigkeit nach dem Erkalten mit destillirtem Wasser sorgfältig in ein Becherglas

¹⁾ Pflüger's Archiv f. die ges. Physiologie, Bd. 67, 1897, S. 363.

²⁾ Pflüger's Archiv f. die ges. Physiologie, Bd. 72.

herausgespült, Ammoniak bis zu alkalischer Reaction und dann Salpetersäure bis zu stark saurer Reaction zugefügt und unter starkem Umrühren die nöthige Menge von Molybdänlösung zugesetzt. Bei der weiteren Ausführung der Bestimmungen bis zum Glühen des Magnesium-Pyrophosphates bin ich im Grossen und Ganzen Fresenius¹⁾ gefolgt.

Die Bestimmung des Gesamtmphosphors im Harn wurde in derselben Weise ausgeführt, wie für Milch und Koth oben angegeben. Je nach der Menge des Phosphorgehaltes wurden 50—200 ccm. Harn zur Bestimmung verwendet und gleich im Anfang nach dem Zusatz von Salpetersäure und vor dem Zusatz von Schwefelsäure auf ein geringes Volumen (etwa 15 ccm.) eingedampft.

Auch die anorganischen Phosphate wurden durch die Wägemethode bestimmt. Ich wollte es vermeiden, für die Bestimmung des Gesamtmphosphors eine Wägemethode und für die der Phosphate eine Titrimethode anzuwenden, da gerade für die Bestimmung von organischem Phosphor, der nur in sehr geringer Menge vorhanden ist und ausserdem nur aus der Differenz von Gesamtmphosphor und anorganischen Phosphaten berechnet wird, die Anwendung einer und zwar exacten Methode nothwendig ist.

Die Harnmenge beim Säugling ist zu gering, als dass eine einzelne Tagesmenge für je 2 Parallelbestimmungen von anorganischem und Gesamtmphosphor ausreichen würde, namentlich wenn man beim geringen Phosphorgehalt des Harns von Brustkindern gezwungen ist, 100—200 ccm. für jede Bestimmung zu verwenden. Ich habe in Folge dessen die Harnmengen der einzelnen Tage während der Dauer eines Versuches vereinigt und diesen Mischharn zu den Phosphorbestimmungen verwendet. Da sämtliche Versuche mit Ausnahme eines einzigen 5 Tage dauerten, stellen meine Zahlen den Durchschnitt einer 5tägigen Periode dar. Dieser Umstand, dass wir es nicht mit Zahlen, die aus der Untersuchung einer einzelnen Tagesmenge sich ergeben, zu thun haben, erhöht meines Erachtens nur den Werth meiner Untersuchungen.

¹⁾ Anleitung zur quantitativen Analyse, II. Band, S. 691.

In der Tabelle*) I gebe ich eine Uebersicht über die Resultate meiner Untersuchungen. Während ich die Krankengeschichten der zu den Versuchen verwendeten Kinder, sowie die Belege für die aus den Phosphorbestimmungen im Harn sich ergebenden Zahlen am Schluss der Arbeit mittheilen und eine ausführliche Besprechung der Stoffwechselversuche, soweit es sich um die Resorption und Retention von N und P_2O_5 handelt, an anderer Stelle beabsichtige, gebe ich in meiner Tabelle das Alter der Kinder an, das Körpergewicht bei Beginn des Versuches, die durchschnittliche tägliche Körpergewichtszunahme und Retention von P_2O_5 . In der zweiten Columnne bezeichne ich die Versuchskinder mit Zahlen, um auszudrücken, welche Versuche an demselben Kind ausgeführt sind. Sämmtliche Zahlen, die die Untersuchung des Harns und der Nahrung betreffen sind Mittelzahlen, wie sie aus den Ergebnissen des ganzen Versuches für den einzelnen Tag berechnet sind. Ich habe zur Erklärung der Tabelle wohl nichts weiter hinzuzufügen als das eine, dass sämmtliche Kinder in 24 Stunden 5 Mahlzeiten erhielten, nur in Versuch I und IX wurden zum Zweck anderweitiger Untersuchungen 10 Mahlzeiten pro Tag verabreicht.

Bei der Anordnung der Versuche wurde übrigens nicht darauf allein Rücksicht genommen, wie man am besten die Bedingungen studiren kann, von denen die Ausscheidung organisch gebundenen Phosphors im Harn abhängig ist, sondern ich ging bei den Versuchen darauf aus, die verschiedenen Vorgänge im Phosphorstoffwechsel des Säuglings überhaupt zu erforschen.

Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, dass die absolute Menge des im Harn ausgeschiedenen organischen Phosphors bei verschiedenen Kindern ziemlich erhebliche Schwankungen zeigt von 0,00218—0,0167 g P_2O_5 . Bei den drei gesunden Kindern fand ich 0,0081—0,0061 und 0,00596 g P_2O_5 in organischer Bindung enthalten. Wir sehen also, dass die absoluten Zahlen erheblich geringer sind, als diejenigen, welche Oertel für den Erwachsenen angibt (ungefähr 0,05 g P_2O_5 , im Maximum 0,12, im Minimum 0,03 g). Wenn wir die Körpergewichte der

*) Die Tabellen sind im Anhang mitgetheilt.

Erwachsenen und der Säuglinge berücksichtigen, so ergibt sich, dass im Verhältniss zum Körpergewicht vom gesunden Kinde erheblich mehr organischer Phosphor im Harn ausgeschieden wird, als vom gesunden Erwachsenen. Dies würde mit der Beobachtung Oertel's übereinstimmen, dass die Grösse der Ausscheidung des organisch gebundenen Phosphors mit der Grösse des Stickstoffumsatzes einhergeht, da wir aus einer genügend grossen Zahl von Stoffwechseluntersuchungen wissen, dass beim wachsenden Organismus die Grösse des Stickstoffumsatzes im Verhältniss zum Körpergewicht bedeutender ist, als beim Erwachsenen. Bei den mannigfachen Verschiedenheiten, die zwischen dem Stoffwechsel des Kindes und des Erwachsenen nicht nur im Betreff der Grösse, sondern auch der Art des Stoffwechsels bestehen, erscheint es mir nicht gerechtfertigt, diese eine Zahl, nämlich die Grösse des Stickstoffumsatzes, zu der Ausscheidung organischen Phosphors in Beziehung zu setzen.

Wenn wir die Grösse der Phosphorausscheidung beim Erwachsenen und beim Kind untereinander vergleichen wollen, erscheinen mir besonders jene Zahlen werthvoll, welche uns angeben, wieviel P_2O_5 im organischen Phosphor auf 100 Theile Gesamtposphor kommen resp. auf 100 Theile Stickstoff. Wir sehen aus den Zahlen der Tabelle, dass gerade in Betreff dieser Zahlen zwischen einzelnen Kindern erhebliche Differenzen bestehen, und zwar finden wir 0,51—9,9 % des Gesamtposphors in organischer Bindung enthalten. Nach den Untersuchungen von Oertel liegen beim Erwachsenen die entsprechenden Zahlen zwischen 1,6 und 4,8 %.

Bei der weiteren Besprechung will ich vom Vergleich meiner Zahlen mit den beim Erwachsenen gefundenen absehen und nur auf Grund der Ergebnisse meiner Untersuchungen der Frage näher treten, von welchen Bedingungen die Grösse der Ausscheidung organischen Phosphors im Harn beim Kinde abhängig ist. Bei der Untersuchung an Säuglingen haben wir den Vortheil, dass wir jene Momente, denen beim Erwachsenen von jeher ein besonderer Einfluss auf den Phosphorwechsel zugeschrieben worden ist, wie die Menge der während der

Untersuchungszeit geleisteten körperlichen oder geistigen Arbeit u. s. w., bei unsern Säuglingen vernachlässigen können, da in dieser Richtung zwischen den einzelnen Individuen kaum erhebliche Differenzen bestehen werden. Um so besser werden wir beurtheilen können, in wie weit die Ausscheidung des organischen Phosphors von der Grösse und Art des Stoffwechsels, von der Menge des in der Nahrung eingeführten Phosphors und der Natur der in der Nahrung enthaltenen Phosphorverbindungen und schliesslich von dem Gesundheitszustand der Kinder abhängig ist.

Um diese Frage gesondert besprechen zu können, habe ich meine Untersuchungsergebnisse in einer Reihe besonderer Tabellen zusammengestellt, in denen nach Möglichkeit nur das eine oder andere Moment Berücksichtigung findet, da bei der grossen Menge von Zahlen die Tabelle I wenig übersichtlich erscheint. Ich habe in Tabelle II meine Zahlen nach der Menge des in der Nahrung eingeführten Phosphors geordnet. Im Grossen und Ganzen ist dies gleichzeitig, wie wir uns überzeugen können, ein Maassstab für die Grösse des Stoffwechsels überhaupt, wenn wir den einen Versuch VII unberücksichtigt lassen, bei dem der Nahrung (Frauenmilch) Natriumphosphat zugesetzt wurde und so künstlich ganz besondere Verhältnisse des Phosphorstoffwechsels geschaffen wurden.

Aus den Zahlen dieser Tabelle scheint mir mit genügender Sicherheit hervorzugehen, dass die Grösse des Stickstoffumsatzes, soweit wir sie aus dem Stickstoffgehalt von Nahrung und Harn erschliessen können, keinen erheblichen Einfluss auf die Grösse der Ausscheidung organischen Phosphors im Harn ausübt. Denn die Zahlen für die absolute Menge des organischen Phosphors und die für das Verhältniss von organischem Phosphor zum Gesamtposphor gehen weder den Stickstoffzahlen noch den für Phosphor in Harn und Nahrung gefundenen Zahlen parallel.

Zur weiteren Charakteristik des Stoffwechsels habe ich in Tabelle III die Versuche nach den aus der Untersuchung der Retention von Phosphor im Organismus sich ergebenden

Zahlen geordnet und in Tabelle IV nach der Grösse der Körpergewichtszunahme.

Ein Blick auf die betreffenden Zahlenreihen zeigt uns, dass von einem Parallelgehen der absoluten resp. Verhältnisszahlen für die Ausscheidung organischen Phosphors mit denen der täglichen P_2O_5 -Retention oder mit denen der Körpergewichtszunahme keine Rede ist. Wir mussten also schliessen, dass die Grösse des Umsatzes von Stickstoff und Phosphor im Körper auf die Ausscheidung von organischem Phosphor keinen Einfluss hat.

Um aus der Menge der zur Verfügung stehenden Zahlen doch noch ein klareres Bild zu bekommen, welche Momente auf die Grösse der Ausscheidung von organischen Phosphorverbindungen im Harn einen Einfluss haben, habe ich schliesslich noch zwei Tabellen zusammengestellt, in deren ersterer (Tab. V) die Versuche nach der Höhe der absoluten Zahlen der Ausscheidung organischen Phosphors geordnet sind, je nach dem mehr oder weniger organischer Phosphor im Verhältniss zum Gesamtposphor im Harn enthalten ist.

Die Zahlen dieser Tabelle zeigen dass die Grösse der Ausscheidung organischen Phosphors bis zu einem gewissen Grade von der Art der Nahrung abhängig ist, insofern als im Allgemeinen bei Ernährung mit Kuhmilch höhere Zahlen sich finden als bei Ernährung mit Frauenmilch. Wir sehen allerdings, dass in der Kuhmilch, auch in der verdünnten, stets mehr, zum Theil erheblich mehr Phosphor in der Nahrung eingeführt wird, als in der Frauenmilch. Aus dieser Reihe fallen zwei Versuche auf: der Versuch XII und X. In dem ersten wird auch bei Ernährung mit Kuhmilch nicht mehr organischer Phosphor ausgeschieden als von den Brustkindern; es handelt sich jedoch um ein normal gedeihendes Kind. Und im zweiten scheidet das Kind bei Ernährung mit Malzsuppe trotz ziemlich grosser Mengen von Nahrungs- P_2O_5 weniger organischen Phosphor aus, als selbst die Brustkinder.

Schliesslich will ich noch erwähnen, dass die absolute Menge des organischen Phosphors im Harn durch den

Zusatz von Natriumphosphat zur Nahrung nicht beeinflusst wird.

Dass die Art der Nahrung thatsächlich von wesentlicher Bedeutung ist, sehen wir am besten, wenn wir Tabelle VI betrachten: Bei Ernährung mit Frauenmilch wird im Allgemeinen mehr organischer Phosphor im Verhältniss zum Gesamtposphor ausgeschieden, als bei Ernährung mit Kuhmilch. Wir könnten leicht daran denken, dass dies seinen Grund darin hat, weil sich in der Frauenmilch fast sämtlicher Phosphor in Form von organischen Verbindungen befindet, während die Kuhmilch erhebliche Mengen von Phosphaten enthält. Es widerspricht dieser Erklärung nur der eine Fall X, in dem bei Ernährung mit Malzsuppe, die doch mehr organische Phosphorverbindungen enthält als eine in demselben Verhältniss verdünnte Kuhmilch, nur 0,51% des Gesamtposphors in organischer Bindung ausgeschieden wird.

Inwieweit die Ausscheidung organischen Phosphors im Harn von der Grösse des allgemeinen Stoffwechsels, von der Art der Ernährung u. s. w. abhängig ist, diese Fragen würden leichter zu beantworten gewesen sein, wenn mir eine Reihe von physiologischen Zahlen, gewonnen aus der Untersuchung gesunder Kinder, zur Verfügung gestanden hätte. Leider war mir dazu nur in den 3 Fällen Gelegenheit geboten und ich war darum gezwungen, in meine Tabellen auch die an kranken Kindern gewonnenen Zahlen einzustellen. Um aber die letzteren verwerthen zu können, wäre der Nachweis erforderlich, welchen Einfluss der Gesundheitszustand des Individuums auf die Ausscheidung organischer Phosphorverbindungen hat. Bei Betrachtung der verschiedenen Tabellen, namentlich von Tabelle V und VI, tritt die bemerkenswerthe Thatsache hervor, dass das kranke Kind weniger organische Phosphorverbindungen im Harn ausscheidet als das gesunde bei der gleichen Ernährung. Diese Beobachtung erklärt uns zum Theil wenigstens die Widersprüche, auf die ich bei der Besprechung der einzelnen Tabellen immer wieder stiess und die auch durch die Verschiedenartigkeit des Untersuchungsmaterials nicht genügend begründet erschienen. Wenn die gesunden Säuglinge relativ mehr orga-

nischen Phosphor im Harn ausscheiden als die magendarmkranken Kinder bei derselben Ernährung, so können die organischen Phosphorverbindungen nicht aus der eingeführten Nahrung allein stammen, zumal wir aus den Untersuchungen der Ammoniakausscheidung wissen, dass bei den Ernährungsstörungen der Säuglinge eine Verminderung der Oxydationsfähigkeit des Organismus besteht. Wir werden also zu dem Schluss gedrängt, dass die im Harn erscheinenden organischen Phosphorverbindungen auch einer anderen Quelle als der Nahrung entstammen und zum Theil aus dem Zerfall von Körpersubstanz herrühren oder im Körper entstehen.

Mit dieser Annahme würde sich das Verhalten der Ausscheidung organischen Phosphors im Harn bei verschiedener Ernährung vollständig vereinbaren. Die Höhe der Procentzahlen, die das Verhältniss von organischem Phosphor zum Gesamtposphor im Harn bezeichnen, ist bei den Brustkindern in Wesentlichen dadurch bedingt, dass die Menge des Gesamtposphors bei Ernährung mit Frauenmilch im Vergleich zu der mit Kuhmilch stark absinkt, während die Ausscheidung organischen Phosphors nicht in demselben Maasse vermindert wird. Wenn nun der Theil der organischen Phosphorverbindungen, der nicht aus der Nahrung stammt, bei verschiedenen Kindern ungefähr gleich ist, so würde sich erklären, dass die Ausscheidung des organischen Phosphors nicht in derselben Weise wie die des Gesamtposphors steigt und sinkt. Denn der Einfluss der Ernährungsart kann unter diesen Umständen nicht so deutlich hervortreten, als wenn der im Harn erscheinende organische Phosphor vollständig aus nicht oxydirten organischen Verbindungen der Nahrung herrührt.

Die Frage, ob die organischen Phosphorverbindungen des Harns aus der Nahrung allein kommen, lässt sich direkt durch Versuche, bei denen keine Nahrung oder phosphorfreye Nahrung dem Körper zugeführt wird, beantworten. Ueber diese Versuche will ich im Folgenden berichten.

Bei einem 11 Monate alten Kinde, das wegen einer Magendarmerkrankung in die Klinik aufgenommen wurde und bei dem aus therapeutischen Gründen eine absolute Wasserdiät

zur Leerstellung des Darmes indicirt war, habe ich während dieser Zeit den Harn untersucht, und zwar wurde am 24. Juli, Nachmittags 3 Uhr, der Harnrecipient angelegt, nachdem das Kind seit dem 23. Juli früh, also seit ungefähr 30 Stunden, keine Nahrung, ausser Wasser mit Saccharin versüsst, erhalten hatte. Dieselbe Diät wurde bis zum 25. Juli, Nachmittags 3 Uhr, beibehalten und ebenso lange Zeit blieb der Recipient liegen. Es wurden 620 ccm. Harn ausgeschieden, darin waren enthalten:

Als Gesamtposphor	0,4308 g
in Form von Phosphaten	0,4247 "

also in organischer Form $0,0061 \text{ g} = 1,4\%$ des Gesamtposphors.

Nach den Erfahrungen über die Schnelligkeit, mit der die Nahrung beim Säugling den Darm passiert, sowie aus der Beobachtung der Veränderungen im Aussehen des Stuhles bei unserem Kinde durfte ich annehmen, dass zu der Zeit, als der Harnrecipient angelegt wurde, die letzten Reste von Nahrung aus dem Darm verschwunden waren, und dass der aufgesammelte Harn in Wirklichkeit dem Hungerzustande entspricht.

Um mich nicht wiederholen zu müssen, will ich über die weitere Durchführung des Versuches in chronologischer Reihenfolge berichten. An den beschriebenen Versuch wurde nämlich ein zweiter angeschlossen, um zu constatiren, ein wie grosser Theil des Kothphosphors aus der Nahrung und wie viel aus dem Zerfall von Darmepithelien und aus den Verdauungssäften stammt. Da nun eine Wasserdiät in diesem Falle keine günstigen Bedingungen für die Entscheidung der Frage bot, weil die Ausscheidung der Verdauungssäfte in hohem Grade von der Zuführung der Nahrung abhängig ist, gab ich dem Kinde eine Nahrung, welche keinen Phosphor oder wenigstens nur minimale Mengen enthält, welche aber, wie aus den Körpergewichtswägungen hervorging, ungefähr ausreichend war, um das Kind im Körpergleichgewicht zu erhalten. Ich verwendete Protogen, eine Eiweissart, welche nach den Angaben von

Blum¹⁾ aus dem Eiweiss von frischen Hühnereiern durch Behandlung mit Formaldehyd hergestellt wird.

$\left. \begin{array}{l} 0,0125 \text{ g} \\ 0,0128 \text{ g} \end{array} \right\} \text{im Mittel } 0,01265 \text{ g Magnesiumpyrophosphat} = 0,00809 \text{ g P}_2\text{O}_5.$

Nach der 2 $\frac{1}{2}$ tägigen Periode absoluter Wasserdiät wurde der Versuch in der Weise weitergeführt, dass das Kind am 25. Juli im Laufe des Nachmittags und der Nacht eine Lösung von 5,5 g Protogen als Nahrung erhielt, am 26. und 27. eine Lösung von je 10 g Protogen. Die mit Saccharin versüsste Nahrung wurde gut getrunken.

Am 27. Juli, Abends 7 Uhr, erhielt das Kind zum letzten Mal Protogen, von da an wieder Saccharinwasser. Der Harnrecipient blieb bis zum 28. Juli, Nachmittags 3 Uhr, liegen; es war also anzunehmen, dass der der Protogendarreichung entsprechende Harn bis zu dieser Zeit vollständig entleert war. In den drei Tagen hatte das Kind im Ganzen 0,020227 g P₂O₅ erhalten, also pro Tag im Durchschnitt 0,00674 g P₂O₅.

Während der Protogenperiode wurden entleert:

1. Versuchstag	1070 ccm. Harn	} 3340 ccm.
2. >	1010 > >	
3, >	1260 > >	

Um für jede einzelne Bestimmung des Phosphors möglichst grosse Quantitäten von Harn verwenden zu können, wurden auch in diesem Versuch die Tagesportionen zu einem Mischharn vereinigt, in denen die Bestimmungen ausgeführt wurden. Nach den Resultaten derselben ergeben sich pro Tag 1113 ccm. Harnmenge, darin sind enthalten:

1,6756 g Stickstoff, 0,2861 g P₂O₅ als Gesamtphosphor, 0,0084 g P₂O₅ als organischer Phosphor = 2,9% des Gesamtphosphors.

Im Uebrigen ist hervorzuheben, dass ich bei der Untersuchung dieses Harns, sowohl für die Bestimmung des Gesamtphosphors wie für die der anorganischen Phosphate, je 4 Kontrollbestimmungen und noch dazu in 200 bis 500 ccm. Harn ausführte, um meiner Zahlen sicher zu sein. Die Parallelbestimmungen ergaben gut übereinstimmende Werthe.

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XXII, 1896/97, S. 126. Protogen wird von den Farbwerken, vormals Meister, Lucius u. Brüning hergestellt.

Nach der Protogenperiode blieb der Harnrecipient noch 24 Stunden länger, also bis zum 29. Juli, Nachmittags, liegen. Da 20 Stunden seit der letzten Mahlzeit bis zum Beginn des Harnaufsammeins vergangen waren, ist anzunehmen, dass der in den 24 Stunden vom 28. zum 29. Juli entleerte Harn dem Hungerzustand entspricht.

Die Untersuchung des Harns ergab in 1520 ccm. Tagesmenge:

1,4098 g N und 0,2140 g P_2O_5 als Gesamtposphor.
0,0081 g P_2O_5 als organischer Phosphor = 3,8 % des Gesamtposphors.

Als bei demselben Kind nach einiger Zeit das Allgemeinbefinden und die Magendarmerscheinungen wiederum eine Entleerung des Darmes erforderlich machten, habe ich auch diese 2. Hungerperiode zur Untersuchung von Harn und Koth benutzt. Am 10. August, Abends 8 Uhr, erhielt das Kind die letzte Mahlzeit Malzsuppe, von da an wiederum nur Saccharinwasser. Am 12. August, früh 8 Uhr, also nach 36 stündiger Wasserdiät, wurde der Recipient angelegt. Um zu beobachten, in welcher Weise die Zusammensetzung des Harns sich im Verlauf der Hungerperiode ändert, wurde der Harn der ersten 12 Stunden bis zum 12. August, Abends 8 Uhr, gesondert aufgefangen und dann weiter 24 Stunden bis zum 13. August. In den ersten 12 Stunden wurden 700 ccm. Harn ausgeschieden, deren Untersuchung ergab:

0,1849 g P_2O_5 als Gesamtposphor,
0,0049 g P_2O_5 als organischer Phosphor = 2,3 % des Gesamtposphors.

Während des letzten Tages wurde absichtlich dem Kind weniger Saccharinwasser angeboten, um einen concentrirten Harn zu erhalten und so das umständliche Einengen grösserer Harnmengen, wie es für die Bestimmung der Phosphorsäure in stark verdünntem Harn nothwendig ist, zu vermeiden. In den 24 Stunden wurden in 820 ccm. Harnmenge entleert:

1,3776 g N und 0,3293 g P_2O_5 als Gesamtposphor,
0,0074 g P_2O_5 als organischer Phosphor = 2,2 % des Gesamtposphors.

Der Uebersichtlichkeit wegen stelle ich die aus diesem Versuch sich ergebenden Zahlen in einer Tabelle zusammen.

Datum	Harnmenge in 24 Stunden	Menge des Stickstoffs	Menge des Gesamt- phosphors	Organischer Phosphor		Bemerkungen
				absolute Menge	% des Gesamt- P ₂ O ₅	
24.-25. Juli	620 ccm.	1,725 g	0,2081 g	0,0061 g	1,4 %	Wasserdiaät
25.-28. »	1113 »	1,6756 »	0,2861 »	0,0084 »	2,9 %	Protagon
28.-29. »	1520 »	1,4098 »	0,2140 »	0,0081 »	3,8 %	Wasserdiaät
12. Aug. 1)	1400 »	—	0,3698 »	0,0086 »	2,3 %	»
12.-13. Aug.	820 »	1,3776 »	0,3293 »	0,0074 »	2,2 %	»

Die Frage, die mir zu dem Versuch Veranlassung gab, ob nämlich der im Harn ausgeschiedene organische Phosphor ausschliesslich aus der Nahrung stammt, wird durch die vorliegenden Zahlen dahin beantwortet, dass dies nicht der Fall ist. Wir sehen, dass die organischen Phosphorverbindungen nicht aus dem Harn verschwinden, wenn auch gar keine Nahrung zugeführt wird oder die gereichte Nahrung keine organischen Phosphorverbindungen resp. nur minimale, kaum in Betracht kommende Mengen desselben enthält. In dem vorliegenden Falle müssen die organischen Phosphorverbindungen des Harns aus dem Körper selbst stammen. Es ist dies allerdings kein Beweis, dass auch dann, wenn wir genügend Nahrung darreichen, um den Körper auf seinem Bestand zu erhalten, resp., wie dies beim Säugling nothwendig ist, um ein Wachsthum zu ermöglichen, die gleiche Menge organischer Phosphorverbindungen im Körper frei wird oder entsteht und auch zur Ausscheidung kommt, aber es ist nach dem Ergebniss der Protagonperiode wohl als wahrscheinlich anzunehmen.

Die absolute Menge des ausgeschiedenen Phosphors ist an den einzelnen Versuchstagen ziemlich constant, und zwar wird an den Hungertagen ebensoviel organischer Phosphor ausgeschieden, als an den Tagen, wo eine phosphorfreie, aber zur Erhaltung des Körpergleichgewichts genügende Nahrung zugeführt wurde. Es ist dies ein weiterer Beweis, dass die Grösse

1) Die Zahlen aus der Untersuchung der 12stündigen Harnmenge sind verdoppelt, um sie mit den andern Zahlen leichter vergleichen zu können.

des Stickstoffumsatzes auf die Ausscheidung von organischem Phosphor im Harn keinen wesentlichen Einfluss ausübt.

Was das Verhältniss vom organischen Phosphor zum Gesamtposphor im Harn anbetrifft, so unterscheiden sich die Zahlen nicht wesentlich von denen, wie wir sie bei Kuhmilchernährung beim Säugling finden, und stimmen im Allgemeinen mit denen überein, welche Oertel beim Erwachsenen gefunden hat.

Ich verzichte auf eine Besprechung jener Zahlen, die sich auf die Ausscheidung von Gesamtposphor im Hungerzustand und bei partiellem Phosphorhunger beziehen, und will nun noch die aus diesem Versuch sich ergebenden Zahlen mit jenen Zahlen vergleichen, die ich bei demselben Kind bei Ernährung mit unverdünnter Kuhmilch gefunden hatte. Bei Zufuhr von 1,9699 g P_2O_5 in der Nahrung wurden im Harn 0,851 g Gesamtposphor und als organischer Phosphor 0,014 g P_2O_5 , also 2,1 % des Gesamtposphors, ausgeschieden. Wir sehen also, dass bei Zufuhr von phosphorreicher Nahrung, die auch genügend organische Phosphorverbindungen enthält, nur wenig mehr organischer Phosphor im Harn ausgeschieden wird, als bei Hungerdiät.

Meinem Versuche, während dessen das Kind gar keine Nahrung resp. keinen Phosphor in der Nahrung zugeführt erhielt, kann ich jene Versuche gegenüberstellen, in denen eine phosphorreiche Substanz als Nahrung eingeführt wird. Bei seinen Fütterungsversuchen mit Casein am Hund stellte Marcuse¹⁾ fest, ob Phosphor im Harn in organischer Bindung ausgeschieden wurde. Er bestimmte die Phosphorsäure im nativen Harn und in der Asche des Harns durch Titrirung mit Urannitritlösung und kam zu dem Resultat, dass die nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter erhaltenen Werthe stets um ein Geringes höher sind, als die der direkten Titrirung. «Die Unterschiede liegen aber dem Titirfehler so nahe, dass er keinen sicheren positiven Schluss zu ziehen wagt», und wir dürfen wohl in Folge dessen annehmen, dass die Menge

1) Pflüger's Archiv, Bd. 67, S. 363. 1897.

des organischen Phosphors im Harn trotz der Zufuhr von ausschliesslich organischen Phosphorverbindungen in der Nahrung nicht wesentlich vermehrt ist. Ferner sind Fütterungsversuche mit Glycerinphosphorsäure gemacht worden. Selbst bei Zuführung grosser Mengen Glycerinphosphorsäure-Verbindungen fand Bülow¹⁾ nur eine sehr geringe Menge der Glycerinphosphorsäure im Harn, ebenso Pasqualis²⁾ nur höchstens zweifelhafte Spuren.

Wir sehen also aus meinen Hungerversuchen einerseits und aus den Fütterungsversuchen mit Casein oder Glycerinphosphorsäure andererseits, dass auch bei den grössten Differenzen im Gehalt der Nahrung an organischen Phosphorverbindungen nur geringe Unterschiede im Gehalt des Harns an organischem Phosphor sich finden. Aus alldem ist die Tatsache zu entnehmen, dass der Theil des im Harn erscheinenden organischen Phosphors, welcher aus der Nahrung stammt, nicht bedeutend ist.

Weil bei dem Kinde, welches zu meinen Hungerversuchen und zu den Versuchen mit Protogen diente, eine Ernährungsstörung bestand, konnte ich die eine Annahme nicht vollständig ausschliessen, dass diese Störung die Ursache für das Erscheinen organischen Phosphors im Harn während des Hungerzustandes darstellte. Um dies zu entscheiden, wäre es nothwendig gewesen, bei einem gesunden Kinde im Hungerzustand den Harn zu untersuchen, wozu ich aber naturgemäss keine Gelegenheit hatte, da wir beim gesunden Kinde keine Veranlassung haben, eine Wasserdiät anzuordnen. Diese Lücke glaubte ich am besten dadurch ausfüllen zu können, dass ich an einem Erwachsenen, dessen Ernährungs- und Gesundheitszustand anscheinend normal war, einen Hungerversuch durchführte. Versuchsperson war ich selbst.

Am 13. August Abends hatte ich die letzte Mahlzeit zu mir genommen und von da an bis zum 18. August nichts als Wasser. Vom 14. August früh bis zum 18. August um

1) Plüger's Archiv, Bd. 57, S. 98. 1894.

2) Annali di Chimica e farmacol. 1894. Cit. nach Maly's Jahresbericht, Bd. 24, S. 283. 1895.

dieselbe Zeit habe ich den Harn aufgesammelt. Während des Versuches habe ich von 74,7 kg bis zu 70,8 kg an Körpergewicht abgenommen. Die Untersuchung des Harns in dieser Zeit ergab folgende Werthe:

Datum	Harnmenge	Menge des Stickstoffs	Menge des Gesammt- P_2O_5	Organischer Phosphor	
				absolute Menge	% des Gesammt- P_2O_5
14.-15. Aug.	1020 ccm.	8,211 g	1,858 g	0,017 g	0,91 %
15.-16. >	460 >	6,7459 >	1,9016 >	0,0294 >	1,5 %
16.-17. >	1220 >	7,9117 >	2,4393 >	0,0344 >	1,4 %
17.-18. >	1540 >	11,4807 >	2,5265 >	0,0573 >	2,3 %

Demnach wird auch vom gesunden Erwachsenen im Hungerzustand organischer Phosphor ausgeschieden, der wohl zum Theil aus Zerfall von Körpersubstanz, zum Theil aus Secreten herrührt.

In Betreff der Ausscheidung von Gesammtphosphor und organischem Phosphor im Harn stimmen die Ergebnisse meines Hungerversuches im Grossen und Ganzen mit den Zahlen überein, die Oertel für den Erwachsenen bei gemischter Diät gefunden hat. Wenn auch die Menge des Stickstoffs im Harn niedriger ist als unter normalen Verhältnissen, so wird doch während des Hungerzustandes im Durchschnitt ebensoviel Phosphorsäure ausgeschieden, als bei ausreichender Ernährung. Auch das Verhältniss vom organischem Phosphor zum Gesammtphosphor im Harn ändert sich nur wenig; es erscheint auffallend, dass gerade am ersten Hungertage die niedrigsten Zahlen in Betreff der Ausscheidung des organischen Phosphors sich finden. Wenn die 4 Tage eine genügend lange Versuchsperiode darstellen, um irgend welche Schlüsse zu erlauben, so würden sie darauf hindeuten, dass während einer Hungerperiode die Ausscheidung organischen Phosphors im Harn ansteigt, und zwar schneller als die Gesammtphosphorsäure, von der wir bereits wissen, dass während des Hungerns nicht weniger ausgeschieden wird, als während ausreichender Ernährung.

Wenn wir uns fragen, aus welchen Organen oder Geweben die organischen Phosphorverbindungen stammen, die während des Hungerzustandes im Harn ausgeschieden werden, so können uns dafür Untersuchungen, wie sie z. B. von Chossat, C. Voit, S. Munk und zuletzt von Weiske ausgeführt wurden, einen Anhaltspunkt geben, jene Untersuchungen, bei denen festgestellt wurde, in welcher Weise die verschiedenen Organe des Thierkörpers sich an dem beim Hunger eintretenden Körperverluste betheiligen und wie sich die Zusammensetzung der betreffenden Organe ändert. Wir wissen, dass das an Phosphaten reiche Skelett auch bei lange dauerndem Hunger nur unbedeutend an Gewicht verliert und am Schluss des Hungerversuchs noch ungefähr denselben Gehalt an Phosphor aufweist, wie am Anfang desselben.

Bekannt ist ausserdem aus den Versuchen von Chossat, Bibra u. A., dass das Gehirn und Rückenmark bei Inanition nicht abnimmt resp. dass demselben auf Kosten anderer Organe Ersatz geliefert wird.

Dagegen betheiligen sich an den beim Hunger eintretenden Körperverluste hauptsächlich Milz, Leber, Lunge, Därme etc., gerade jene Organe, die durch einen hohen Gehalt an Nuclein ausgezeichnet sind.

Ist unter diesen Umständen der Schluss unberechtigt, dass gerade der Zerfall der nucleinreichen Organe die Quelle des im Harn erscheinenden organischen Phosphors im Hungerzustand ist, wenn wir noch berücksichtigen, dass die organische Phosphorverbindung, welche hauptsächlich im Gehirn und Rückenmark enthalten ist, nämlich das Lecithin, leichter verbrennbar ist, als die übrigen organischen Phosphorverbindungen?

Zuletzt will ich noch auf die Frage eingehen, in wie weit der Gehalt des Harns an organischen Phosphorverbindungen ein Mittel zur Prüfung der Oxydationsfähigkeit des betreffenden Organismus sein könnte. Aus meinen Untersuchungen ergibt sich das Resultat, dass der im Harn ausgeschiedene organische Phosphor zum Theil aus der Nahrung stammt, zum Theil aus dem Abbau von Körpersubstanz oder aus Secreten der verschiedenen Organe. Wenn wir diese

beiden Theile trennen könnten, dann würde die Grösse der Ausscheidung des aus der Nahrung stammenden Phosphors einen Maassstab für die Oxydationskraft des Organismus darstellen, vorausgesetzt, dass wir verschiedenen Kindern gleiche Mengen von bestimmten organischen Phosphorverbindungen in der Nahrung zuführen würden.

Was den zweiten Theil des organischen Phosphors im Harn, den aus dem Körper stammenden anbetrifft, so liegt bisher kein Beweis vor, dass dessen Grösse von der Oxydationsfähigkeit des Organismus abhängt. Im Gegentheile scheint mir das Resultat des Hungerversuches, den ich an mir selbst ausgeführt habe, nur darauf hinzudeuten, dass im Körper organische Phosphorverbindungen entstehen oder frei werden, die ausgeschieden werden, bevor sie noch verbrannt werden können.

Tabelle II.

Nr. des Versuches	Untersuchung der Nahrung				Untersuchung des Harns			
	Art der Nahrung	Bemerkungen	Gehalt an N	Gehalt an P_2O_5	Gehalt an N	Gehalt an Gesamt- P_2O_5	organischer Phosphor	
							Menge in g P_2O_5	% des Gesamt- P_2O_5
IX	Vollmilch	10 Mahlzeiten	4,7754 g	1,9699 g	3,599 g	0,851 g	0,014 g	2,1 %
III	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch		2,06 >	0,857 >	1,6056 >	0,3637 >	0,0167 >	4,6 %
X	Malzsuppe		1,8754 >	0,8496 >	0,8625 >	0,4235 >	0,00218 >	0,51 %
XII	$\frac{1}{2}$ Kuhmilch	Normales Kind	2,226 >	0,8248 >	1,3257 >	0,4108 >	0,00596 >	1,5 %
VII	Frauenmilch	+ Na_2HPO_4	1,7295 >	0,8204 >	0,5676 >	0,3863 >	0,0045 >	1,15 %
I	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch	10 Mahlzeiten	1,4375 >	0,519 >	1,2395 >	0,4412 >	0,0125 >	3,7 %
XIII	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch		1,3671 >	0,4808 >	0,9379 >	0,3629 >	0,01604 >	4,5 %
VIII	Muttermilch	Normales Kind	1,875 >	0,3248 >	0,7875 >	0,0982 >	0,0081 >	8,2 %
II	Ammenmilch		1,5116 >	0,28 >	0,7553 >	0,09 >	0,0044 >	4,9 %
VI	Ammenmilch		1,6006 >	0,2679 >	0,623 >	0,0875 >	0,00602 >	6,9 %
XI	Ammenmilch		1,5279 >	0,2635 >	0,6081 >	0,1164 >	0,00598 >	5,1 %
IV	Muttermilch	Normales Kind	1,4083 >	0,24024 >	0,7696 >	0,06181 >	0,0061 >	9,9 %
V	Ammenmilch	beständige Nahrungsmenge	1,132 >	0,1878 >	0,6937 >	0,1063 >	0,0024 >	2,2 %
								0,34 %

Tabelle III.

Nr. des Versuches	Retention von P_2O_5	Gehalt des Harns			Art der Nahrung	Bemerkungen
		an Gesamt- P_2O_5	organischer Phosphor			
			Menge in g P_2O_5	% des Gesamt- P_2O_5		
XII	0,3068 g	0,4106 g	0,00596 g	1,5 ‰	$\frac{2}{3}$ Kuhmilch Ammenmilch	Normales Kind + Na_2HPO_4
VII	0,2735 „	0,3863 „	0,0045 „	1,15 ‰		
IX	0,2197 „	0,8510 „	0,014 „	2,1 ‰	Vollmilch	10 Mahlzeiten
VIII	0,1754 „	0,0982 „	0,0081 „	8,2 ‰	Muttermilch	Normales Kind
III	0,1607 „	0,3637 „	0,0167 „	4,6 ‰	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch	Normales Kind
IV	0,1283 „	0,0618 „	0,0061 „	9,9 ‰	Muttermilch	
II	0,0987 „	0,09 „	0,0044 „	4,9 ‰	Ammenmilch	Normales Kind
VI	0,0986 „	0,0875 „	0,00602 „	6,9 ‰	Ammenmilch	
XI	0,0847 „	0,0164 „	0,00598 „	5,1 ‰	Ammenmilch	10 Mahlzeiten
X	0,0795 „	0,4235 „	0,00218 „	0,51 ‰	Malzsuppe	
I	0,0776 „	0,3347 „	0,00125 „	3,7 ‰	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch	Beschränkte Nahrungs- menge
XIII	0,0381 „	0,3629 „	0,001604 „	4,5 ‰	$\frac{1}{3}$ Kuhmilch	
V	0,0326 „	0,1053 „	0,0024 „	2,2 ‰	Ammenmilch	

Tabelle IV.

Nr. des Versuches	Tägliche Körper- gewichts- zunahme	Gehalt des Harns			Art der Nahrung	Bemerkungen
		an Gesamt- P ₂ O ₅	organischer Phosphor			
			Menge in g P ₂ O ₅	% des Ge- samt-P ₂ O ₅		
IX	+ 48 g	0,8510 g	0,014 g	2,1 %	Vollmilch	10 Mahlzeiten
VII	+ 44 „	0,8863 „	0,0045 „	1,15 %	Ammenmilch	+ Na ₂ HPO ₄
VIII	+ 28 „	0,0982 „	0,0081 „	8,2 %	Muttermilch	Normales Kind
VI	+ 28 „	0,0875 „	0,00602 „	6,9 %	Ammenmilch	
II	+ 22 „	0,09 „	0,0044 „	4,9 %	Ammenmilch	
XI	+ 14 „	0,1164 „	0,00598 „	5,1 %	Ammenmilch	
I	+ 12,5 „	0,3347 „	0,0125 „	3,7 %	1/3 Kuhmilch	10 Mahlzeiten
IV	+ 10 „	0,0618 „	0,0061 „	9,9 %	Muttermilch	Normales Kind
X	+ 6 „	0,4235 „	0,00218 „	0,51 %	Malzsuppe	
XIII	— 4 „	0,3629 „	0,01604 „	4,5 %	1/3 Kuhmilch	
XII	— 6 „	0,4106 „	0,00596 „	1,5 %	2/3 Kuhmilch	Normales Kind
III	— 12,5 „	0,3637 „	0,0167 „	4,6 %	1/3 Kuhmilch	
V	— 22 „	0,1053 „	0,0024 „	2,2 %	Ammenmilch	Beschränkte Nahrungs- menge

12*

Tabelle V.

Nr. des Versuches	Untersuchung der Nahrung				Körper- gewichts- zunahme pro die Stunden	pro die retinirter P ₂ O ₅	Untersuchung des Harns				
	Art der Nahrung	Bemerkungen	Menge von P ₂ O ₅				Menge des Stickstoffs	Menge des Gesamt- P ₂ O ₅	organischer Phosphor		N
			in der Nahrung von 24 Stunden	in 1000 g der Nahrung					Menge in g P ₂ O ₅	auf 100 Theile Ges.- P ₂ O ₅	
III	2	1/2 Kuhmilch		0,857	1,315	g	g	g	g	%	%
XIII	4	1/3 Kuhmilch		0,4808	0,695	— 4	0,1607	0,3637	0,0167	4,6	1,04
IX	6	Vollmilch	10 Mahlzeiten	1,9699	1,9777	+ 48	0,0381	0,3629	0,01604	4,5	1,7
I	1	1/3 Kuhmilch	10 Mahlzeiten	0,519	0,815	+ 12,5	0,2197	0,8510	0,014	2,1	0,39
VIII	5	Muttermilch	Normales Kind	0,3248	0,3822	+ 28	0,0776	1,116	0,0125	3,7	1,08
IV	3	Muttermilch	Normales Kind	0,24024	0,386	+ 10	0,1754	0,7875	0,0081	8,2	1,0
VI	4	Ammenmilch		0,2679	0,377	+ 28	0,0986	0,623	0,0061	9,9	0,79
XI	4	Ammenmilch		0,2635	0,343	+ 14	0,0847	0,608	0,00598	6,9	0,96
XII	5	2/3 Kuhmilch	Normales Kind	0,8248	0,852	— 6	0,3068	1,3257	0,00596	5,1	0,98
VII	4	Ammenmilch	+ Na ₂ HPO ₄	0,8204	1,207	+ 44	0,2735	0,5676	0,0045	1,5	0,45
II	2	Ammenmilch		0,28	0,4	+ 22	0,0987	0,7553	0,0044	1,15	0,79
V	4	Ammenmilch	Beschränkte Nah- rungsmenge	0,1878	0,417	— 22	0,0326	0,6937	0,0024	4,9	0,58
X	1	Malzsuppe		0,8496	1,344	+ 6	0,0795	0,8625	0,00218	2,2	0,34
										0,51	0,25

Tabello VI.

Nr. des Versuches	Untersuchung der Nahrung			Untersuchung des Harns			
	Art der Nahrung	Bemerkungen	Menge von P_2O_5		Menge des Stickstoffs	organischer Phosphor	
			in der Nahrung von 24 Stunden	in 1000 g der Nahrung		Menge in g P_2O_5	auf 100 Theile
			g	g	g	g	Ge.- P_2O_5
					pro die retinirter P_2O_5		N
					g		%
IV	3	Muttermilch	0,24024	0,386	0,1283	0,7696	9,9
VIII	5	Muttermilch	0,3248	0,3822	0,1754	0,7875	8,2
VI	4	Ammenmilch	0,2679	0,377	0,0986	0,623	6,9
XI	4	Ammenmilch	0,2635	0,348	0,0847	0,608	5,1
II	2	Ammenmilch	0,28	0,4	0,0987	0,7553	4,9
III	2	$\frac{1}{2}$ Kuhmilch	0,857	1,315	0,1607	1,6056	4,6
XIII	4	$\frac{1}{2}$ Kuhmilch	0,4808	0,695	0,0381	0,9379	4,5
I	1	$\frac{1}{2}$ Kuhmilch	0,519	0,815	0,0776	1,116	3,7
V	4	Ammenmilch	0,1878	0,417	0,0326	0,6937	2,2
IX	6	Vollmilch	1,9699	1,9777	0,2197	3,5991	2,1
XII	5	$\frac{1}{2}$ Kuhmilch	0,8248	0,852	0,3068	1,3257	1,5
VII	4	Ammenmilch	0,8204	1,207	0,2735	0,5676	1,15
X	1	Malzsuppe	0,8496	1,344	0,0795	0,8625	0,51
						0,4235	0,25

Krankengeschichten.

Kind 1.

Die ersten 14 Tage an der Brust, dann mit $\frac{1}{3}$ Kuhmilch in 2stündigen Pausen ernährt, wurde am 24. April 1899 — 11 Wochen alt — in die Poliklinik gebracht, weil nach Angabe der Pflegefrau das Kind seit einigen Tagen sehr unruhig war, weniger trank als vorher und häufig erbrach.

Ziemlich mageres blasses Kind von 4100 g Körpergewicht. Zeichen von beginnender Rachitis, Bronchitis, Hernia inguinalis dextra.

Nach der Aufnahme in die stationäre Abtheilung erhält das Kind auch weiterhin 2 stündlich $\frac{1}{3}$ Kuhmilch, von der es zuerst 1000 bis 900 g, später weniger trinkt. In den ersten Tagen bestehendes Erbrechen verschwindet. Dabei nahm das Kind bis zum 10. Mai etwa 300 g an Körpergewicht ab. An diesem Tage wird Versuch I begonnen. Wenige Tage nach Beendigung des Versuches traten Erscheinungen von Seiten des Magendarmkanals auf, die uns veranlassten, das Kind weiterhin mit Frauenmilch zu ernähren. Dabei besserte sich langsam das Allgemeinbefinden, sowie die Verdauungsstörung, die Körpergewichtskurve ging zwar bis Ende Mai noch weiter herunter (29. Mai 3160 g), dann aber blieb das Körpergewicht einige Zeit zwischen 3100 und 3200 g stehen. Vom 19. Juni an erhielt das Kind Malzsuppe und es trat unter dem Einfluss der Ernährung gleichzeitig mit dem weiteren Fortschreiten der Besserung im Allgemeinbefinden und im Ernährungszustand regelmässige Körpergewichtszunahme ein.

Am 11. Juli (Körpergewicht 3640 g) wurde ein Stoffwechselversuch (Nr. X) begonnen, während dessen das Kind täglich 631,5 g Malzsuppe in 5 Mahlzeiten erhielt.

Kind 2.

Wurde am 15. März 1899 — $\frac{1}{4}$ Jahr alt — in die Poliklinik gebracht. Von der Pflegefrau, welche erst kurze Zeit das Kind in Pflege hat, ist betreffs der Vorgeschichte nur soviel zu erfahren, dass Magen-darmstörungen nicht bestanden haben sollen und dass das Kind seit einiger Zeit huste. Als Nahrung wurde verabreicht $\frac{1}{3}$ Milch mit $\frac{2}{3}$ Haferschleim.

Das ziemlich magere, damals 3840 g schwere Kind, bei dem eine Bronchitis constatirt wurde, blieb bei derselben Ernährung und nahm bis zum 3. Mai 1 kg an Körpergewicht zu. Es wurde an diesem Tage in die stationäre Abtheilung aufgenommen und vom 12. Mai an, da in der Zwischenzeit Magendarmstörungen aufgetreten waren, mit Frauenmilch ernährt. Bei dieser Ernährung wurde Versuch II durchgeführt. Nach dem Versuch erhielt das Kind $\frac{1}{3}$ Kuhmilch, später $\frac{1}{2}$ Kuhmilch.

Am 30. Mai wurde Versuch III begonnen, während dessen das Kind täglich 360 g Kuhmilch mit 290 g Wasser verdünnt als Nahrung erhielt.

Kind 3.

Am 30. März 1899 als erstes Kind von gesunden Eltern geboren, mit einem Körpergewicht von 2920 g. Brustkind. Am 4. Tage hatte das Kind bis zu 2650 g abgenommen, von da an ging die Körpergewichtskurve mit nur sehr geringen Schwankungen regelmässig in die Höhe. Am 9. Tage ist das Anfangsgewicht erreicht, am 1. Mai 3620 g, am 1. Juni 4400 g. Anzahl und Aussehen der Stühle sind normal, nie Zeichen einer Magendarmkrankung, ausgenommen die eine Beobachtung, dass das Kind, wenn es nach dem Trinken auf die Waagschale gelegt wird, hin und wieder geringe Mengen von Nahrung aus dem Mund zurückfliessen lässt. Vom 6. bis zum 11. Juni Stoffwechselversuch (IV). Das Verhalten des Kindes in der späteren Zeit, seine weitere Entwicklung und körperliche Zunahme zeigt uns, dass wir es mit einem anscheinend gesunden Brustkinde zu thun haben.

Während des Versuches erhält das Kind 5 Mahlzeiten, trinkt jedesmal an beiden Brüsten. Die Menge der getrunkenen Nahrung wird durch Wägung des Kindes vor und nach dem Anlegen bestimmt. Zur Untersuchung der Nahrung werden vor und nach der Mahlzeit Proben der Milch aus der Brust entnommen.

Kind 4.

Erstes Kind gesunder Eltern, wurde in den ersten 10 Tagen an der Brust, dann mit $\frac{1}{3}$ Kuhmilch in 3 stündlichen Pausen ernährt. Am 1. Juni wurde das 8 Wochen alte Kind von der Mutter mit der Angabe in die Poliklinik gebracht, dass es vor etwa 10 Tagen erkrankt sei. Die Stühle seien wässrig, Nahrung würde öfter verweigert und das Kind sei im Körpergewicht heruntergekommen.

Das Kind, welches bei der Aufnahme 3130 g wog, war ziemlich stark abgemagert und blass. An den inneren Organen nichts Abnormes. Bei Wasserdiet nimmt das Kind in 24 Stunden 100 g an Körpergewicht ab, um dann bei Ernährung mit Frauenmilch mehr und mehr zuzunehmen. In dieser Zeit regelmässiger Zunahme wurden die Versuche V, VI und VII durchgeführt und zwar die beiden ersten bei Ernährung mit Frauenmilch, beim 3. Versuch wurden der Frauenmilch Natriumphosphate zugesetzt. In der späteren Zeit, etwa von Anfang Juli an, traten häufig

wiederum neue Erkrankungen ein, deren acute Erscheinungen zwar stets bald verschwanden, die aber doch der Grund waren, dass das Kind während der nächsten Wochen an Körpergewicht nicht zunahm. In dieser Zeit wurde bei Ernährung mit Frauenmilch Versuch XI und bei Ernährung mit verdünnter Kuhmilch Versuch XIII durchgeführt.

Kind 5.

Am 6. Mai 1899 mit einem Körpergewicht von 2870 g geboren, hereditär nicht belastet, von Anfang an der Brust ernährt. Nach der physiologischen Körpergewichtsabnahme hatte das Kind am 9. Lebens-tage sein Anfangsgewicht wieder erreicht und nahm von da an regel-mässig zu. Mit Ausnahme einer kurzen Periode von etwa 8 Tagen, in der das Kind Zeichen einer leichten Magendarmerkrankung zeigte, war das Allgemeinbefinden des Kindes stets ungestört. Am Ende des ersten Lebensmonats wog das Kind 3420 g, am Ende des zweiten Monats 4400 g, am Ende des 3. Monats 5160 g. Die weitere Entwicklung des Kindes und seine Körpergewichtszunahme entsprach normalen Verhält-nissen. Es wurde bei dem Kinde zuerst ein Versuch (VIII) bei Ernährung mit Frauenmilch gemacht und 3 Wochen später ein Versuch XII bei Ernährung mit $\frac{2}{3}$ Kuhmilch.

Kind 6.

Wurde am 20. Januar 1899, 3 Monate alt, in unsere Poliklinik gebracht. Der Vater soll an Schwindsucht gestorben sein. Das Kind wurde von Anfang an künstlich ernährt und zwar in 2 stündlichen Pausen mit verdünnter Kuhmilch. Wegen starker Diarrhöe musste diese Ernährung nach 4 Wochen aufgegeben werden, das Kind erhielt von da an Hafergrütze mit Milch. In der letzten Zeit häufiges starkes Erbrechen.

Das schlecht genährte Kind mit 3370 g Körpergewicht, an dem ausser Zeichen von Rachitis nichts Abnormes nachweisbar war, wurde mit verdünnter Malzsuppe ernährt, erholte sich dabei zusehends und nahm im Laufe von 5 Wochen um etwa 600 g an Körpergewicht zu. Dann erkrankte es von Neuem an einer Magendarmstörung, nahm bis 3300 g an Körpergewicht ab, um dann im Laufe der Monate April und Mai langsam bis zu 3900 g zuzunehmen. Im Laufe des Monats Juni wurde das Kind nie vorgezeigt, erst am 10. Juli erschien die Mutter in der Poli-klinik. Nach ihrer Angabe hat das Kind in der Zwischenzeit täglich etwa 1 Liter unverdünnte Kuhmilch in 1—2 stündlichen Pausen getrunken.

Das mittlerweile 10 Monate alte Kind von 4300 g Körpergewicht war sehr blass, am Skelett Zeichen von Rachitis, an den inneren Organen nichts Abnormes nachweisbar. Nach der Aufnahme in die Klinik wurde bei derselben Ernährung, d. h. bei Darreichung von Vollmilch in 2stünd-lichen Pausen ein Stoffwechselversuch durchgeführt. Da das Kind in den nächsten Tagen nach dem Versuch häufig erbrach und ausserdem an Körpergewicht abnahm, wurde am 23. Juli die Nahrung ausgesetzt.

Beläge.

Versuch I.

Datum	Harnmenge	N in 10 ccm.	P ₂ O ₅ ¹⁾ in 50 ccm.	pro die werden aus- geschieden	
				N	P ₂ O ₅
11. V. 1899	330 ccm.	31,15 mg	46,66 mg	1,0279 g	0,3079 g
12. V. 1899	375 >	28,0 >	42,04 >	1,050 >	0,3156 >
13. V. 1899	475 >	27,3 >	37,19 >	1,2967 >	0,3533 >
14. V. 1899	395 >	28,35 >	38,42 >	1,0892 >	0,3035 >
	1575 ccm.			4,4639 g	1,2800 g

Vom Mischharn der ganzen Periode werden zu den Wägeb-
stimmungen des Phosphors je 50 ccm. verwendet. Bei vorhergehender
Verbrennung der organischen Substanzen nach Neumann finden sich:

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,0666 g, II. 0,0664 g,
Mittel 0,0665 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,0425 g P_2O_5 ; demnach in 1575 ccm.
Harn: 1,3387 g P_2O_5 .

B. Direkte Fällung mit Molybdänsäure (anorganische
Phosphate) in 50 ccm. I. 0,0639 g, II. 0,0641 g, Mittel 0,064 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
= 0,0409 g P_2O_5 ; demnach in 1575 ccm. Harn 1,2694 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1575 ccm. Harn: 0,0499 g P_2O_5 .

Versuch II.

Datum	Harnmenge	N in 10 ccm.	P ₂ O ₅ ²⁾ in 50 ccm.	pro die werden aus- geschieden	
				N	P ₂ O ₅
16. V. 1899	420 ccm.	19,95 mg	7,21 mg	0,8379 g	0,0606 g
17. V. 1899	335 >	22,4 >	11,78 >	0,7504 >	0,0789 >
18. V. 1899	240 >	26,25 >	17,32 >	0,630 >	0,0831 >
19. V. 1899	285 >	27,65 >	18,25 >	0,788 >	0,1040 >
20. V. 1899	220 >	35,0 >	22,64 >	0,770 >	0,0996 >
	1500 ccm.			3,7763 g	0,4262 g

1) Durch Titration mit Urannitratlösung bestimmt.

2) Durch Titration bestimmt.

Mischharn.

A. Gesammtphosphor in 100 ccm. I. 0,0467 g, II. 0,0471 g, Mittel 0,0469 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,029997 \text{ g P}_2\text{O}_5$ demnach in 1500 ccm. 0,4499 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate. Die Wägeb Bestimmungen gehen verloren. Die direkte Titration von 50 ccm. des Mischharns ergibt 0,014322 g P_2O_5 , das sind in 1500 ccm. 0,42966 g P_2O_5 . Bei der Titration der einzelnen Tagesmengen hatte ich gefunden in 1500 ccm. Harn 0,4262 g P_2O_5 . Als Mittelwerth ergibt sich also 0,4279 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1500 ccm. Harn 0,022 g P_2O_5 .

Versuch III.

Datum	Harnmenge	N in 10 ccm.	P_2O_5 in 50 ccm.	pro die werden aus- geschieden	
				N	P_2O_5
30. V. 1899	400 ccm.	36,05 mg	34,419 mg	1,442 g	0,2753 g
31. V. 1899	365 >	43,05 >	50,47 >	1,5713 >	0,3684 >
1. VI. 1899	300 >	48,3 >	55,902 >	1,449 >	0,3354 >
2. VI. 1899	335 >	56,0 >	62,139 >	1,8766 >	0,4163 >
3. VI. 1899	340 >	49,7 >	53,13 >	1,6898 >	0,3379 >
	1740 ccm.			8,0281 g	1,7333 g

A. Gesammtphosphor in 50 ccm. I. 0,0813 g, II. 0,0821 g, Mittel 0,0817 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,052255 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1740 ccm. 1,8185 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate: I. 0,0777 g, II. 0,0782 g, Mittel 0,07795 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,04986 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1740 ccm. 1,7351 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1740 ccm. — 1,7351 g P_2O_5 .

Versuch IV.

Datum	Harnmenge	N in 10 ccm.	P_2O_5 in 50 ccm.	pro die werden aus- geschieden	
				N	P_2O_5
7. VI. 1899	300 ccm	23,45 mg	6,77 mg	0,7035 g	0,0406 g
8. VI. 1899	365 >	22,75 >	8,0625 >	0,83037 >	0,0589 >
9. VI. 1899	425 >	18,9 >	6,77 >	0,80325 >	0,0575 >
10. VI. 1899	375 >	19,95 >	8,385 >	0,7481 >	0,0629 >
11. VI. 1899	445 >	17,15 >	6,1275 >	0,7632 >	0,0545 >
	1910 ccm.			3,8484 g	0,2745 g

Mischharn.

A. Gesamtposphor in 100 ccm. I. 0,0251 g, II. 0,0255 g, Mittel 0,0253 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,01618 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1910 ccm. = 0,30904 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 100 ccm. I. 0,0230 g, II. 0,0226 g, Mittel 0,0228 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,01458 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1910 ccm. = 0,2785 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1910 ccm. = 0,0305 g P_2O_5 .

Versuch V.

Datum	Harnmenge	N in 10 ccm.	N pro die
7. VI. 1899	220 ccm.	29,4 mg	0,6468 g
8. VI. 1899	220 „	31,85 „	0,7007 „
9. VI. 1899	225 „	30,8 „	0,693 „
10. VI. 1899	240 „	30,1 „	0,7227 „
11. VI. 1899	240 „	29,4 „	0,7056 „
	1145 ccm.		3,4685 g

Mischharn.

A. Gesamtposphor in 100 ccm. I. 0,0717 g, II. 0,0721 g, Mittel 0,0719 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,04599 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1145 ccm. = 0,5266 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 100 ccm. I. 0,0708 g, II. 0,0698 g, Mittel 0,0703 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,04496 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1145 ccm. = 0,5148 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1145 ccm. = 0,0118 g P_2O_5 .

Versuch VI.

Datum	Harnmenge
20. VI. 1899	380 ccm.
21. VI. 1899	320 „
22. VI. 1899	300 „
23. VI. 1899	345 „
24. VI. 1899	435 „
	1780 ccm.

Mischharn 10 ccm. = 17,5 mg N,
1780 ccm. = 3,115 g N.

A. Gesamtposphor in 100 ccm. I. 0,0388 g, II. 0,0381 g, Mittel 0,03845 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,02459 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1780 ccm. = 0,4377 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 100 ccm. I. 0,0355 g, II. 0,0361 g, Mittel 0,0358 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0229 \text{ g P}_2\text{O}_5$; demnach in 1780 ccm. = 0,40762 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1740 ccm. = 0,0301 g P_2O_5 .

Versuch VII.

Datum	Harnmenge	P ₂ O ₅ in 50 ccm.	P ₂ O ₅ pro die
28. VI. 1899	230 ccm.	87,075 mg	0,4005 g
29. VI. 1899	245 „	173,505 „	0,850175 „
30. VI. 1899	310 „	56,76 „	0,3519 „
1. VII. 1899	335 „	24,8325 „	0,1664 „
2. VII. 1899	415 „	14,5 „	0,1189 „
	1530 ccm.		1,8879 g

Mischharn 10 ccm. = 1855 mg N, 1530 ccm. = 2,838 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,0991 g, II. 0,0983 g, Mittel 0,0987 g Mg₂P₂O₇ = 0,06313 g P₂O₅; demnach in 1530 ccm. = 1,9317 g P₂O₅.

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,0976 g, II. 0,0976 g Mg₂P₂O₇ = 0,0624 g P₂O₅; demnach in 1530 ccm. = 1,9094 g P₂O₅.

C. Organischer Phosphor in 1530 ccm. = 0,0223 g P₂O₅.

Versuch VIII.

Datum	Harnmenge
5. VII. 1899	550 ccm.
6. VII. 1899	460 „
7. VII. 1899	550 „
8. VII. 1899	580 „
9. VII. 1899	570 „
	2710 ccm.

Mischharn 10 ccm. = 14,53 mg N.
2710 ccm. = 3,9376 g N.

A. Gesamtposphor in 150 ccm. I. 0,0427 g, II. 0,0423 g, Mittel 0,0425 g Mg₂P₂O₇ = 0,0271 g P₂O₅; demnach in 2710 g = 0,4910 g P₂O₅.

B. Anorganische Phosphate in 150 ccm. I. 0,0389 g, II. 0,0391 g, Mittel 0,039 g Mg₂P₂O₇ = 0,02494 g P₂O₅; demnach in 2710 g = 0,4506 g P₂O₅.

C. Organischer Phosphor in 2710 ccm. Harn = 0,0404 g P₂O₅.

Versuch IX.

Datum	Harnmenge
12. VII. 1899	310 ccm.
13. VII. 1899	340 „
14. VII. 1899	270 „
15. VII. 1899	450 „
16. VII. 1899	430 „
	1800 ccm.

Mischharn 10 ccm. = I. 100,1 mg N, II. 99,75 mg N, Mittel 99,975 mg N; also 1800 ccm. = 17,9955 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 1851 g, II. 0,1845 g, Mittel 0,1848 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,1182 g P_2O_5 ; demnach in 1800 ccm. = 4,2552 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,1814 g, II. 0,1805 g, Mittel 0,18095 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,1157 g P_2O_5 ; demnach in 1800 ccm. = 4,1652 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1800 ccm. = 0,09 g P_2O_5 .

Versuch X.

Datum	Harnmenge
12. VII. 1899	160 ccm.
13. VII. 1899	200 „
14. VII. 1899	160 „
15. VII. 1899	160 „
16. VII. 1899	225 „
	905 ccm.

Mischharn 10 ccm. = I. 47,2 mg, II. 48,1 mg, Mittel 47,65 mg N; also 905 ccm. = 4,3123 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,1828 g, II. 1831 g, Mittel 0,18295 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,1170 g P_2O_5 ; demnach in 905 ccm. = 2,1177 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,1822 g, II. 0,1819 g, Mittel 0,18205 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,1164 g P_2O_5 ; demnach in 905 ccm. = 2,1068 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 905 ccm. = 0,0109 g P_2O_5 .

Versuch XI.

Datum	Harnmenge
26. VII. 1899	370 ccm.
27. VII. 1899	420 „
28. VII. 1899	465 „
29. VII. 1899	315 „
30. VII. 1899	370 „
	1940 ccm.

Mischharn 10 ccm. = 1575 mg N, 1940 ccm. = 3,0405 g N.

A. Gesamtposphor in 100 ccm. I. 0,0467 g, II. 0,0471 g, Mittel 0,0469 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,0300 g P_2O_5 ; demnach in 1940 ccm. = 0,582 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 100 ccm. I. 0,0448 g, II. 0,0442 g, Mittel 0,0445 g $Mg_3P_2O_7$ = 0,02846 g P_2O_5 ; demnach in 1940 ccm. = 0,5521 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1940 ccm. = 0,0299 g P_2O_5 .

Versuch XII.

Datum	Harnmenge.
26. VII. 1899	535 ccm.
27. VII. 1899	700 „
28. VII. 1899	675 „
29. VII. 1899	650 „
30. VII. 1899	650 „
	3210 ccm.

Mischharn. 10 ccm. = 20,65 mg N,
3210 ccm. = 6,62865 g N.

A. Gesammtphosphor in 100 ccm.
I. 0,1000 g, II. 0,1000 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,06396 g P_2O_5 ; demnach in 3210 ccm. = 2,0531 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 100 ccm. I. 0,0988 g, II. 0,0983 g, Mittel 0,09855 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,06303 g P_2O_5 ; demnach in 3210 ccm. = 2,0233 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 3210 ccm.
Harn = 0,0298 g P_2O_5 .

Versuch XIII.

Datum	Harnmenge
9. VIII. 1899	150 ccm.
10. VIII. 1899	450 „
11. VIII. 1899	420 „
12. VIII. 1899	510 „
13. VIII. 1899	580 „
	2110 ccm.

Mischharn 10 ccm. = 0,0222 g N,
2110 ccm. = 4,6895 g N.

A. Gesammtphosphor in 50 ccm.
I. 0,0670 g, II. 0,0676 g, Mittel 0,0673 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,0430 g P_2O_5 ; demnach in 2110 ccm. = 1,8146 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,0644 g, II. 0,0640 g, Mittel 0,0642 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,0411 g P_2O_5 ; demnach in 2110 ccm. = 1,7344 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 2110 ccm.
= 0,0802 g P_2O_5 .

Hungerversuch am Kind.

24.—25. Juli 1899.

620 ccm. Harn.

10 ccm. = 27,825 mg N, 620 ccm. = 1,72515 g N.

A. Gesammtphosphor in 300 ccm. 0,3253 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,2081 g P_2O_5 ; demnach in 620 ccm. = 0,4308 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 300 ccm. 0,3192 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,2042 g P_2O_5 ; demnach in 620 ccm. = 0,4247 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 620 ccm. = 0,0061 g P_2O_5 .

Darreichung von Protogen.

25.—28. Juli 1899.

1 g Protogen = I. 0,0125 g, II. 0,0128 g, Mittel 0,01265 g $Mg_2P_2O_7$ = 0,00809 g P_2O_5 .

Datum	Harnmenge	
25.—26. VII. 1899	1070 ccm.	Mischharn.
26.—27. VII. 1899	1010 „	10 ccm. = 15,05 mg N.
27.—28. VII. 1899	1260 „	3340 „ = 5,0267 g N.
	3340 ccm.	

A. Gesamtposphor in 500 ccm. Harn = 0,2002 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 200 ccm. Harn = 0,0800 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 200 ccm. Harn = 0,0810 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$; also enthalten 100 ccm. Harn I. 0,04004 g, II. 0,0400 g, III. 0,0405 g, Mittel 0,04018 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 3340 ccm. = 1,3420 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,8583 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 300 ccm. = 0,1168 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 500 ccm. = 0,1970 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 200 ccm. = 0,0782 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 200 ccm. = 0,0792 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$; also enthalten 100 ccm. I. 0,0389 g, II. 0,0394 g, III. 0,0391 g, IV. 0,0386 g, Mittel 0,0390 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 3340 ccm. = 1,3026 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,8331 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 3340 ccm. = 0,0252 g P_2O_5 .

28.—29. Juli 1899.

Harnmenge 1520 ccm. 10 ccm. = 9,275 mg N, 1520 ccm. 1,4098 g N.

A. Gesamtposphor in 300 ccm. I. 0,0657 g II. 0,0663 g, Mittel 0,0660 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,04221 g P_2O_5 ; demnach in 1520 ccm. = 0,2140 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 300 ccm. I. 0,0635 g, II. 0,0635 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,04061 g P_2O_5 ; demnach in 1520 ccm. = 0,2059 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1520 ccm. Harn = 0,0081 g P_2O_5 .

12. August 1899.

Harnmenge von 12 Stunden 700 ccm.

A. Gesamtposphor in 150 ccm. I. 0,0621 g, II. 0,0618 g, Mittel 0,06195 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,03962 g P_2O_5 ; demnach in 700 ccm. = 0,1806 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 150 ccm. I. 0,0603 g, II. 0,0610 g, Mittel 0,06065 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,03879 g P_2O_5 ; demnach in 700 ccm. = 0,1806 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 700 ccm. = 0,0043 g P_2O_5 .

12.—13. August 1899.

Harnmenge 820 ccm. 10 ccm. = 16,8 mg N, 820 ccm. = 1,3776 g N.

A. Gesamtposphor in 150 ccm. I. 0,0931 g, II. 0,0941 g, Mittel 0,0936 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,05987 g P_2O_5 ; demnach in 820 ccm. = 0,3293 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 150 ccm. I. 0,0920 g, II. 0,0915 g, Mittel 0,09175 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,0585 g P_2O_5 ; demnach in 820 ccm. = 0,3219 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 820 ccm. Harn = 0,0074 g P_2O_5 .

Selbstversuch.

14.—15. August 1899.

Harnmenge 1020 ccm. 10 ccm. = 80,5 mg N, 1020 ccm. = 3,211 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,2231 g, II. 0,2222 g, Mittel 0,22265 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,1424 g P_2O_5 ; demnach in 1020 ccm. = 1,858 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,2205 g, II. 0,2207 g, Mittel 0,2206 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,1411 g P_2O_5 ; demnach in 1020 ccm. = 1,8410 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1020 ccm. = 0,0170 g P_2O_5 .

15.—16. August 1899.

Harnmenge 460 ccm. 10 ccm. = 146,65 mg N, 460 ccm. = 6,7459 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,3236 g, II. 0,3228 g, Mittel 0,3232 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,2067 g P_2O_5 ; demnach in 460 ccm. = 1,9016 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,3182 g, II. 0,3180 g, Mittel 0,3181 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,2035 g P_2O_5 ; demnach in 460 ccm. = 1,8722 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 460 ccm. = 0,0294 g P_2O_5 .

16.—17. August 1899.

Harnmenge 1220 ccm. 10 ccm. = 64,85 mg N, 1220 ccm. = 7,9117 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,1566 g, II. 0,1560 g, Mittel 0,1563 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,09997 g P_2O_5 ; demnach in 1220 ccm. = 2,4393 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,1544 g, II. 0,1538 g, Mittel 0,1541 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,09856 g P_2O_5 ; demnach in 1220 ccm. = 2,4049 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1220 ccm. = 0,0344 g P_2O_5 .

17.—18. August 1899.

Harnmenge 1540 ccm. 10 ccm. = 74,55 mg N, 1540 ccm. = 11,4807 g N.

A. Gesamtposphor in 50 ccm. I. 0,1286 g, II. 0,1279 g, Mittel 0,12825 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,08203 g P_2O_5 ; demnach in 1540 ccm. = 2,5265 g P_2O_5 .

B. Anorganische Phosphate in 50 ccm. I. 0,1253 g, II. 0,1257 g, Mittel 0,1255 g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ = 0,08017 g P_2O_5 ; demnach in 1540 ccm. = 2,4692 g P_2O_5 .

C. Organischer Phosphor in 1540 ccm. = 0,0573 g P_2O_5 .

Spaltungsprodukte des Hämatins.

(II. Mittheilung.)

Ueber die Hämatine verschiedener Darstellungs- und Blutarten.

Von

William Küster.

(Die Untersuchungen sind mit Unterstützung des Elizabeth-Thompson Science Fund in Boston ausgeführt worden.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Januar 1900.)

Die vorliegenden Versuche bezwecken eine Ergänzung der früher veröffentlichten Arbeiten.¹⁾ Es war gezeigt worden, dass bei der in eisessigsaurer Lösung durch Chromate erfolgenden Oxydation des Hämatins als charakteristische Spaltungsprodukte die «zweibasische Hämatinsäure $C_8H_9NO_4$ » und das «Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure $C_8H_8O_5$ » auftreten. Daneben wurde ausser Kohlensäure die Bildung bald geringer, bald erheblicher Mengen Ammoniaks nachgewiesen, womit das wechselweise Vorwalten von $C_8H_9NO_4$ und $C_8H_8O_5$ wahrscheinlich im Zusammenhange stand. Nachdem dann auch die Methoden zur Trennung²⁾ letzterer Säuren ausgearbeitet worden

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 1 und 34. — Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch eine fehlerhafte Angabe berichtigen, die sich in der Arbeit von Kölle und mir befindet. Das Hämatoporphyrin ist mit einer Chromatmenge oxydirt worden, welche «6» und 8, nicht wie auf Seite 34, 35 und 37 angegeben ist, 12 und 8 Atomen Sauerstoff entspricht.

2) l. c. pag. 23 war gezeigt worden, dass beim Behandeln eines Gemisches der Säuren mit Calciumcarbonat häufig ein Theil der Säure nicht reagirt und sich mit Aether ausschütteln lässt. Es war die Vermuthung ausgesprochen worden, dass letztere Theile mit $C_8H_9NO_4$ identisch sein dürften.

Dies ist in der That der Fall. Die Säure gibt nämlich bei erneuter Behandlung mit Calciumcarbonat ein wasserlösliches Kalksalz,

waren, erschien es möglich zu entscheiden, ob beide Säuren als primäre Spaltungsprodukte anzusehen sind oder — was wahrscheinlicher — ob unter gewissen Bedingungen, die nun zu ermitteln waren, der Uebergang des als primäres Oxydationsprodukt anzusehenden Körpers $C_8H_9NO_4$ in $C_8H_8O_5$ schon während der Oxydation selbst, d. h. also in saurer Lösung, stattfindet.¹⁾

Die erstere Annahme, dass also auch $C_8H_8O_5$ primäres Spaltungsprodukt sei, war ja von vornherein nicht unmöglich; ein solches Verhalten konnte z. B. in dem inneren Bau der nach verschiedenen Methoden oder aus verschiedenen Blutarten hergestellten Hämine begründet sein. Viel wahrscheinlicher war es allerdings, dass die während der Oxydation eingehaltene Temperatur oder vielleicht intensive Belichtung eine Rolle spiele, oder dass bei der Ueberführung der Hämine in Hämatin Veränderungen in verschiedener Richtung vor sich gehen, je nachdem in der Hitze oder bei gewöhnlicher Temperatur gearbeitet wurde, was sich nun bei der Oxydation bemerkbar machte. Letzteres war um so wahrscheinlicher, als ja diese Oxydation mit einer Wasseraufnahme Hand in Hand geht; ja, nach einigen Analysen schien sogar schon die Zusammensetzung der Hämatine von der Art der Darstellung abhängig zu sein.

das nach dem Umkrystallisiren sich in folgender Weise zusammengesetzt zeigte:

0,1334 g, über Schwefelsäure getrocknet, verloren im Vacuum 0,0074 g, dann bei 110° noch 0,001 g und liessen 0,0172 g CaO zurück = 9,83 % Ca (berechnet 9,90 % für $(C_8H_9NO_4)_2$ Ca). Die regenerierte Säure, aus Essigester zweimal umkrystallisiert, zeigte bei langsamem Erhitzen den richtigen Schmelzpunkt $113,5^\circ$ (corrigirt).

1) Durch Natronlauge wird dieser Uebergang ja leicht bewirkt. Ich möchte hier erwähnen, dass die zur Reinigung der Rohsäuren dienenden Operationen stets gleichmässig ausgeführt wurden, namentlich geschah das Lösen in Natriumcarbonat in der Kälte, die alkalische Lösung wurde dann rasch dreimal mit Aether ausgeschüttelt, um dann sofort wieder angesäuert zu werden, so dass in dieser kurzen Zeit eine Ammoniakabspaltung nicht eintreten konnte. Allerdings muss man rasch arbeiten: als eine Lösung von $C_8H_9NO_4$ in Soda eine Stunde stehen blieb, hatten sich bereits Spuren von $C_8H_8O_5$ gebildet.

In den beiden folgenden Tabellen sind nun die unter den angeführten Verhältnissen¹⁾ gewonnenen Resultate getrennt angeordnet, zwei Versuche, II 4 und 7, fanden, was die Analysen der Calciumsalze betrifft, schon in der ersten Mittheilung Verwendung, die übrigen Analysen sind neu ausgeführt worden. Was die Ammoniakabspaltung betrifft, so sind ebenfalls einige Resultate wiederholt aufgeführt.

Wie man sieht, wurde neuerdings das «vorwiegende» Auftreten von $C_8H_8O_5$ nicht mehr beobachtet, ja die einwandfreisten Versuche²⁾ ergaben das Fehlen dieser Säure, so dass also die Annahme, $C_8H_8O_5$ könne als primäres Spaltungsprodukt auftreten, nicht aufrecht erhalten werden kann. Es liefert das Hämatin, ob es nun nach Nencki's oder nach Schalfejew's Methode³⁾ dargestellt ist, ob es aus Pferde-

1) Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass noch andere Factoren in Betracht zu ziehen sind.

2) Die Versuche, I 3 und 4, welche verhältnissmässig viel $C_8H_8O_5$ ergaben, wurden zu Ende geführt, nachdem die Rohsäure 4 Monate aufbewahrt worden war.

3) In neuester Zeit habe ich auch das Mörner'sche Hämin untersucht, nachdem es mir mit Hülfe genauer Angaben, welche mir Herr Professor Dr. Mörner in liebenswürdigster Weise zur Verfügung stellte, gelungen war, die gute Ausbeute von ca. 3 g Hämin aus einem Liter Blut zu erreichen. Im Folgenden gebe ich die Einzelheiten dieser Methode, welche in der That auf die bequemste Weise grössere Mengen Hämins herzustellen gestattet.

1 l. Blut wird mit 3 l. Wasser gemischt und nach Zusatz von 10 ccm. 1%iger Schwefelsäure bis zum lebhaften Aufwallen erhitzt, das Coagulum wird colirt, ausgewaschen und scharf abgepresst. Dann wird mit ca. $\frac{1}{2}$ l. 90%igen Alkohols angerieben und wieder scharf abgepresst. Jetzt wird der Blutkuchen mit 1750 ccm. 90%igen Alkohols, dem ein erkaltetes Gemisch von 17,5 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 17,5 ccm. 90%igen Alkohols zugesetzt ist, verrieben und bei Zimmertemperatur eine Stunde digerirt, dann colirt, der Rest ausgepresst, die erhaltene dunkel gefärbte Lösung filtrirt, das Filtrat in etwa zwei Portionen getheilt, rasch zum Sieden erhitzt und jetzt pro Liter Blut 8 ccm. 25%ige Salzsäure, die mit ca. 12 ccm. 90%igen Alkohols versetzt sind, eingetragen und durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt. Nach zweitägigem Stehen wird der über dem abgesetzten Hämin stehende Alkohol abgegossen, der Krystallbrei abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und im Vacuum getrocknet. Eine Reinigung von etwa noch beigemengtem

Tabelle I.
Versuche mit Rindshämin.¹⁾

	1	2	3	4	5	6	7	8
Methode der Darstellung	Schalfjew	Nencki	Schalfjew	Schalfjew	Schalfjew	Schalfjew	Schalfjew	Schalfjew
Menge des Sauerstoffs	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	20 Atome	20 Atome
Die Oxydation erfolgt	—	an trübten Tagen	in grossem Sonnenlicht	unter Abschluss von Licht	im zerstreuten Licht	—	—	—
Hämin in Hämatin	—	—	—	—	es wird 12 Stunden mit NaOH auf dem Wasserbad erhitzt	kalte NaOH	mit NaOH mehrere Stunden im Sieden erhalten	kalt
Oxydationsprodukt I Menge Farbe	40,0	55,5	55	62,5	60,5 hellbraun	52 braunschwarz	fast 0	—
Menge des erhaltenen Chloranmoniums Stickstoff, in Proc. des im Hämatin vorhandenen	3,2 g 8,9	7 g 19,4	7g 19,1	6 g 16,6	3,9 g 10,8	2,7 g 7,4	8,6 g 23,8	3 g 8,3
Aetherlösliche Rohsäure Gereinigte Rohsäure	40,0 —	32,5 25,5	32,5 31,5	34 26	34 28	36 31,5	46 41,5	48 —
Menge des beim Erhitzen auffall. Calciumsalzes $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6$ in Proc. der geringsten Rohsäure	gering —	Kein Ausfall	4,5 11,4	2,5 8,0	0,5 1,4	0,5 1,3	5,5 10,6	gering —
Lösliches Calciumsalz Wassergehalt des final anhydrit. Calciumsalzes	1,77 1,04 9,82	0 4,59 9,62	0 4,46 9,67	0,52 4,27 9,71	0,7 5,06 9,90	1,96 2,11 9,90	1,87 2,51 9,69	2,46 9,66
a) im Vacuum b) bei 105—110° Ca-Gehalt in Procent Berechnet für $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ 9,90 Schmelzpunkt δ der Säure $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$	113,5—115°	—	115—116°	114—115°	—	113,5—115,5	114,5—116°	114—116°

1) Die Versuche sind zumeist mit 20 g Hämatin ausgeführt worden, in der Tabelle sind alle Werthe der Uebersichtlichkeit halber auf 100 g bezogen.
 2) Im Wassergehalt wurden also wieder die schon früher beobachteten Differenzen gefunden.
 3) Am Normalthermometer zeigte ein reines Präparat den Schmelzpunkt 113,5—114,5°. Hiernach sind alle übrigen Angaben zu berichtigen. Man muss übrigens, um den Schmelzpunkt scharf zu erhalten, bis 100° rasch, dann sehr langsam erhitzen. Hieraus erklären sich die früher angegebenen uncharakteristischen Schmelzpunkte.

Tabelle II.

Versuche mit Pferdehäm. 1)

	1	2	3	4	5	6	7
Methode der Darstellung	Schaffew	Nencki	Nencki	Nencki	Schaffew	Schaffew	Schaffew
Menge des Sauerstoffs	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	12 Atome	21 Atome
Die Oxydation erfolgt	im Licht ²⁾	an trübten Tagen	im Licht	unter Abschluss des Lichts	—	—	—
Häm in Hämatin	—	—	—	—	bei Zimmer-temperatur	in der Hitze (6 Std. gekocht)	—
Oxydationsprodukt I	22,5	38,5	33,5	35	38,0	hellbraun	—
Menge	14,5	6,25	6,5	5,5	2,0	2,0	—
Farbe	40,1	17,3	18	15	5,5	5,5	—
Menge des erhaltenen Chlorammoniums	30	36	37,5	45	37	32	ca. 35
Sickstoff, in Proc. des in Hämatin vorhandenen	26	31	36	44	—	—	—
Aetherlösliche Rohsäure	17,5	2	ca. 0,5	ca. 0,5	—	—	—
Gereinigte Rohsäure	56	ca. 5	ca. 1	ca. 1	—	—	—
Menge des beim Erhitzen aufsteigenden Calciumsalzes $C_6H_9O_6$ in Procenten der geringsten Rohsäure	—	3,23	4,32	—	0	1,11	—
Leichtes Calciumsalz, einmal umkrystallisiert	—	2,37	—	3,93	4,68	2,59	5,35
Wassergehalt im Vacuum bei 110°	—	9,77	9,76	9,71	9,81	9,84	9,87
Ca-Gehalt in Procent	—	—	114—115°	114—115° 3)	113—114°	—	—
Berechnet für $(C_6H_9NO_4)_x$ Ca 9,90	—	—	—	—	—	—	—
Schmelzpunkt der Säure $C_6H_9NO_4$	—	—	—	—	—	—	—

1) Alle Werthe sind in Procenten angegeben.

2) Bei diesem Versuche kam die Lösung des Hämamins während der Oxydation zufällig in grelle Beleuchtung; dies schien mir daher für das Auftreten von $C_6H_9O_6$ von Bedeutung. Die Versuche 3 und 4 zeigen aber, dass das Licht ohne Einfluss ist.

3) Ein Gemisch dieser Säure mit der aus dem I 4 aufgeführten Versuche stammenden schmolz ebenfalls bei 114—115°.

oder aus Rinderblut gewonnen wurde, als primäres Spaltungsprodukt die stickstoffhaltige «zweibasische Hämatinsäure» $C_8H_9NO_4$.

Und ich will gleich hinzufügen, dass dieselbe auch aus einem Hämatin erhalten wurde, zu dessen Herstellung von Schafblut ausgegangen war. Aus Essigester umkrystallisirt, zeigte sie den Schmelzpunkt $113-114^\circ$. Ihr wasserlösliches, einmal umkrystallisirtes Calciumsalz, aus dem sie gewonnen wurde, gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2099 g verloren im Vacuum 0,0020 g, bei 110° noch 0,0073 g und hinterliessen 0,027 g CaO = 0,0193 g Ca.

Berechnet für:		Gefunden:		
$(C_8H_9NO_4)_2$	Ca + 1 H_2O	Im Vacuum	Bei 110°	Ca
H_2O	4,27%	0,95%	3,51%	—
Ca	9,90%	—	—	9,62%

Was die Menge der Rohsäure betrifft, so zeigte ich schon früher, dass die Ausbeute bei Rinderhämatin am günstigsten ist, wenn man ca. 20 Atome Sauerstoff auf das Molekül Hämatin verwendet; sie beträgt dann fast 50% vom Ausgangsmaterial. Fast die gleiche Quantität wurde nun aus Pferdehämatin schon bei Verwendung von 12 Atomen Sauerstoff gewonnen, II 4;¹⁾ unter gleichen Bedingungen kam die Ausbeute beim Rindshämatin nur einmal bis auf 40%. Das könnte an der Reinheit des verwendeten Materials liegen, obwohl bei allen Präparaten, wenn nicht eine völlige, so doch möglichst vollständige Reinigung erstrebt worden war.

Auch möchte ich auf eine weitere Differenz zwischen Rinds- und Pferdehämatin, die sich bei der Spaltung ergibt, aufmerksam machen.

Bei der Oxydation mit 12 Atomen Sauerstoff entsteht ja dabei ein wasser- und ätherunlöslicher, in Alkalien löslicher,

Eiweiss scheint auch hier durch ca. 1%ige Salzsäure zu gelingen. Bisher wurden 6,5 g solchen Hämins nach meiner Methode oxydirt und hierbei die gleichen ätherlöslichen Säuren, wie aus den nach anderen Methoden bereiteten Häminen, erhalten.

¹⁾ Dieser Fall ist nicht vereinzelt; bei einem anderen nicht in die Tabelle aufgenommenen Versuche mit Nencki'schem Hämin wurden sogar 47% Rohsäure erhalten.

als erstes Oxydationsprodukt aufgeführter Körper. Die Menge desselben wurde nun bei Verwendung von Rindshämatin stets bedeutend grösser wie bei Verarbeitung von Pferdehämatin gefunden. Sie stieg dort bis 62,5% vom Ausgangsmaterial, während hier 40% nicht erreicht wurden.

Die genauere Untersuchung dieses Körpers, der ja nach einigen orientirenden Analysen sich als recht verschieden zusammengesetzt erwies und bei verschiedenen Versuchen erhalten, auch schon in der Farbe differirte, wird vielleicht besseren Einblick in die recht complicirten Verhältnisse gestatten.

Um endlich noch einmal auf die Ammoniakabspaltung zurückzukommen, so geht aus den Tabellen nur hervor, dass eine geringe Menge des Stickstoffs des Hämatins in Form dieser Verbindung austreten kann, ohne dass Theile von $C_8H_8NO_4$ in $C_8H_8O_5$ übergehen. Starke Belichtung¹⁾ oder das Erhitzen des Hämatins mit Natronlauge vor der Oxydation erweisen sich als einflusslos, sobald nur mit 12 Atomen Sauerstoff oxydirt wird. Werden aber 20 Atome verwendet, wird also der als erstes Oxydationsprodukt bezeichnete Körper fast völlig wegoxydirt, so scheinen, wie sich aus I 7 und 8 ergibt, grössere Mengen von Ammoniak und auch von $C_8H_8O_5$ dann aufzutreten, wenn das Hämatin vor der Oxydation mit Natronlauge mehrere Stunden gekocht worden war. Doch möchte ich dieser einen Beobachtung noch nicht zu viel Belang zuerkennen.

Was endlich den schon früher besprochenen Fall II 1 betrifft, bei dem 40% des Hämatinstickstoffs als Ammoniak abgespalten und damit im Zusammenhange 56% der Rohsäure als $C_8H_8O_5$ gefunden wurden, so haben die neueren Versuche nicht die erwünschte Aufklärung gebracht.

Auch die Differenzen, welche in der Zusammensetzung der nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämine ge-

¹⁾ In greller Beleuchtung verläuft die Oxydation etwas rascher, weil sich die dunkle Flüssigkeit rasch auf 40—50° erwärmt, doch ist es weit zweckmässiger, im Dunkeln zu operiren, weil dann ein weniger gefärbtes ätherlösliches Rohprodukt erhalten wird.

funden wurden, finden durch vorliegende Arbeit keine Erklärung. Vielmehr konnte erwiesen werden, dass — wie die procentische Zusammensetzung der aus verschiedenen Blutarten erhaltenen Hämine von den Darstellern übereinstimmend gefunden wurde — diese nun auch als best charakterisirtes Spaltungsprodukt die gleiche Säure $C_8H_9NO_4$ geben.

Tübingen, Physiologisch-chemisches Institut, am 17. Januar 1900.

Analytische Belege.

I. 1. 0,6894 g Ca-Salz¹⁾ verloren im Vacuum 0,0122 g, bei 110° noch 0,0068 g und gaben 0,0922 g CaO.

I. 2. 0,3308 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0 g, bei 100 bis 105°: 0,0152 g und gaben 0,0425 g CaO.

I. 3. 0,2241 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 105°: 0,0100 g und gaben 0,0290 g CaO.

I. 4. 0,2473 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0013 g, bei 105°: 0,0105 g und gaben 0,0320 g CaO.

I. 5. 1,0675 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0075 g, bei 105°: 0,0536 g und gaben 0,1395 g CaO.

I. 6. 0,2855 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0056 g, bei 110°: 0,0059 g und gaben 0,0380 g CaO.

I. 7. 0,2674 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,005 g bei 110°: 0,0066 g und gaben 0,0347 g CaO.

I. 8. 0,2085 g Ca-Salz, über H_2SO_4 getrocknet, verloren bei 110°: 0,005 g und gaben 0,0275 g CaO.

II. 2. 0,3833 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0124 g bei 110°: 0,0088 g und gaben 0,0495 g CaO.

II. 3. 0,4770 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0206 g, bei 110°: 0,0004 g und gaben 0,0623 g CaO.

II. 4. 0,3187 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0005 g, bei 110°: 0,0125 g und gaben 0,0413 g CaO.

II. 5. 0,2413 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 105° 0,0113 g und gaben 0,0316 g CaO.

II. 6. 0,3913 g Ca-Salz verloren im Vacuum 0,0045 g, dann bei 105° 0,0104 g und gaben 0,0539 g CaO.

II. 7. 0,1760 g Ca-Salz verloren im Vacuum nichts, bei 110°: 0,0096 g und gaben 0,0230 g CaO.

¹⁾ Das Calciumsalz wurde stets über Schwefelsäure liegend bis zum constanten Gewicht getrocknet.

Ueber die Einwirkung von Jodlösungen und alkalischer Permanganatlösung auf Harnsäure.

Von

Dr. Adolf Jolles,

Docent am k. k. Technologischen Gewerbemuseum in Wien.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. Max und Dr. Adolf Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 19. Januar 1900.)

I.

Ueber die Einwirkung von Jodlösungen auf Harnsäure.

Nach J. Kreidl¹⁾ lassen sich die kleinsten Mengen Harnsäure in der Weise bestimmen, dass man zu der mit einem mässigen Ueberschuss von Normalkali versetzten Harnsäurelösung soviel $\frac{1}{80}$ N-Jodlösung in Jodkalium zufügt, bis die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt erscheint. Nach dreiviertelstündigem Stehen übersäuert man schwach mit Salzsäure und titrirt das überschüssige Jod mit Thiosulfat in bekannter Weise zurück. Kreidl constatirte bei seinen diesbezüglichen Versuchen die auffällige Thatsache, dass bei kürzerer Einwirkung der Jodlösung auf das Molekül Harnsäure mehr Jod verbraucht wird, als bei längerer Einwirkung, und er führte diese Erscheinung auf ein eigenthümliches Verhalten des Harnsäuremoleküls zurück.

Ich habe nun diese Kreidl'schen Versuche mit reinen Harnsäurelösungen wiederholt. Zu diesem Zwecke wurde käufliche, durch Lösen in concentrirter Schwefelsäure und Fällen durch Wasser gereinigte Harnsäure in einer etwa

1) Monatshefte für Chemie, Bd. 14, S. 109, 1893.

Normalnatronlauge gelöst, und die Einwirkung der Jodlösung auf Harnsäure unter mannigfachen Verhältnissen festzustellen versucht. Meine Versuche ergaben zunächst, dass die von Kreidl constatirte auffällige Thatsache, dass bei kürzerer Einwirkung der Jodlösung auf das Molekül Harnsäure mehr Jod verbraucht wird, als bei längerer Einwirkung, durchaus nicht auf ein eigenthümliches Verhalten des Harnsäuremoleküls zurückzuführen ist, sondern einfach ihren Grund darin hat, dass das Jodkalium der Jodlösung durch die Harnsäure unter Jodabscheidung zersetzt wird. Die Richtigkeit dieser Annahme geht daraus hervor, dass nach Zusatz von Jodkalium zu einer alkalischen Harnsäurelösung sich nach etwa einstündigem Stehen Jod ausscheidet, welches durch Stärke nachgewiesen werden kann. Auf Grund dieser Thatsache erklärt sich der Reactionsverlauf folgendermassen: Beim Einfließen der Jodlösung in die Harnsäurelösung wird eine gewisse Menge Jod verbraucht, die man durch sofortige Titration des Ueberschusses bestimmen kann. Lässt man die Flüssigkeit hingegen länger stehen, so scheidet sich in Folge der Wechselwirkung des harnsauren Alkalis und des Jodkaliums Jod aus; da dieses Jod ebenfalls zurücktitrirt werden muss, also mehr Natriumthiosulfat erforderlich ist, so ergibt sich ein scheinbarer Minderverbrauch an Jod.

a) Einwirkung von Jodjodkaliumlösung auf Harnsäure.

Versuch I. 25 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung, entsprechend 0,011701 g Harnsäure, wurden mit 50 ccm. destillirten Wassers und 20 ccm. Jodjodkaliumlösung versetzt, nach 5 Minuten mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung zurücktitrirt.

Titer der Jodjodkaliumlösung: 20 ccm. = 7,78 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. 1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,012525 g Jod.

Beim Zurücktitriren wurden verbraucht 6,53 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, somit wurden 1,25 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung resp. die dieser Lösung entsprechende Jodmenge = 0,0156563 g Jod auf 25 ccm. Harnsäurelösung verbraucht. Demzufolge erfordern 100 g Harnsäure 133,8 g Jod, d. h. zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind nach 5 Minuten langer Einwirkung 133,8 g Jod erforderlich.

Versuch II. 25 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung, entsprechend 0,011701 g Harnsäure, wurden mit 50 ccm. destillirten Wassers

und 20 ccm. Jodjodkaliumlösung versetzt, nach $\frac{3}{4}$ Stunden mit Schwefelsäure angesäuert und mit unterschwefligsaurem Natron zurücktitriert.

Titer der Jodjodkaliumlösung: 20 ccm. = 7,78 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. 1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,012525 g Jod.

Beim Zurücktitriren wurden verbraucht 6,73 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung; somit wurden 1,05 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung resp. die dieser Lösung entsprechende Menge von 0,0131513 g Jod auf 25 ccm. der Harnsäurelösung verbraucht. Demzufolge erfordern 100 g Harnsäure 112,3 g Jod, d. h. zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind nach $1\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung 112,3 g Jod erforderlich.

Versuch III. Der Versuch II mit 50 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung, entsprechend 0,023402 g Harnsäure wiederholt, ergab folgendes Resultat:

0,023402 g Harnsäure erfordern 0,0263031 g Jod, folglich sind zur Veränderung von 100 g Harnsäure nach $\frac{3}{4}$ stündiger Einwirkung 112,4 g Jod erforderlich.

Versuch IV. Von einer frisch hergestellten alkalischen Harnsäurelösung wurden 50 ccm., entsprechend 0,021892 g Harnsäure mit 50 ccm. destillirten Wassers und 47 ccm. Jodjodkaliumlösung versetzt und nach 3 Minuten mit Schwefelsäure angesäuert und zurücktitriert.

Verbraucht 8 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. 47 ccm. Jodjodkaliumlösung = 10,5 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, somit verbraucht 2,5 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,031908 g Jod.

Zur Veränderung von 10 g Harnsäure sind nach Einwirkung von 3 Minuten 145,75 g Jod erforderlich.

Versuch V. 50 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung = 0,021892 g Harnsäure wurden mit 50 ccm. destillirten Wassers und 41,93 ccm. Jodjodkaliumlösung versetzt. Nach 18 stündiger Einwirkung wurde mit Schwefelsäure angesäuert und der Ueberschuss an Jod mit unterschwefligsaurem Natron zurücktitriert.

Verbraucht 7,20 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. 41,93 ccm. Jodjodkaliumlösung entsprachen 9,36 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, somit verbraucht 2,59 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,0275588 g Jod.

Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind nach 18 stündiger Einwirkung 125,89 g Jod erforderlich.

Erwähnenswerth ist, dass in solchen Fällen, wo schon nach kurzer Einwirkung der Jodjodkaliumlösung auf eine alkalische Harnsäurelösung der Jodüberschuss zurücktitriert wird, das Ende der Titration verhältnissmässig schwer zu erkennen ist, indem in dem Momente, wo die Titration beendet ist, ein Nachdunkeln der Flüssigkeit in Folge Freiwerdens von Jod eintritt.

Die angegebenen Versuche bestätigen die Beobachtung Kreidl's, dass bei kürzerer Einwirkung der Jodlösung mehr Jod zur Veränderung der Harnsäure verbraucht wird, als bei längerer Einwirkung, nur ist diese Erscheinung nicht auf das eigenthümliche Verhalten des Harnsäuremoleküls, sondern nur auf die bereits angegebenen secundären Reactionen zurückzuführen.

Die Versuche bestätigen ferner die Angabe Kreidl's, dass bei genauer Einhaltung der Einwirkungsdauer von $\frac{3}{4}$ Stunde die zur Veränderung der Harnsäure nothwendige Jodmenge in proportionellem Verhältnisse zu der verwendeten Harnsäuremenge steht. Nichtsdestoweniger kann diese Methode zur Bestimmung der Harnsäure im Harne für die Zwecke der Praxis nicht ernstlich weiter in Betracht kommen.

b) Einwirkung von Hübl'schen Jodlösungen in verschiedener Concentration auf Harnsäure.

Die nachfolgenden Versuchsreihen hatten zum Zwecke, das Verhalten der Harnsäure gegenüber Hübl'schen Jodlösungen festzustellen, nachdem bekanntlich die Hübl'sche Jodlösung sich vielfach als sehr reactionsfähig erwiesen hat und daher anzunehmen war, dass deren Einwirkung eine tiefer greifende Veränderung der Harnsäure zur Folge haben könnte.

I. Versuche mit sehr verdünnten Hübl'schen Jodlösungen.

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Eine gemessene Menge einer alkalischen Harnsäurelösung von bestimmtem Gehalte wurde mit 50 ccm. verdünnter Schwefelsäure (1 : 10) angesäuert, dann 50 ccm. 96 %iger Alkohol¹⁾, hierauf bestimmte Mengen Hübl'scher Jodlösungen hinzugefügt und öfters geschüttelt. Nach verschiedener Zeitdauer der Einwirkung wurde das überschüssige Jod in bekannter Weise mit Natriumthiosulfatlösung nach vorangegangem Zusatz von Jodkalium (1 : 10) und Stärke zurücktitrit.

1) Der Alkoholzusatz ist erforderlich, um das Jod aus der Hübl'schen Jodlösung in Lösung zu erhalten, da sich sonst, in Folge der Verdünnung, die die Hübl'sche Jodlösung erleidet, Jod ausscheidet.

Versuch I. Titer: 1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,002505 g Jod.
Zu 25 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung = 0,011701 g Harnsäure
wurden hinzugefügt

20 ccm. Hübl'sche Jodlösung = 11,72 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung
nach halbstündiger Einwirkung
zurücktitriert

6,07 " " "

Die Differenz von 5,65 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, resp.
die dieser Lösung entsprechende Jodmenge von 0,0141153 g Jod wurde
zur Veränderung der Harnsäure verbraucht; somit resultiert für 100 g
Harnsäure ein Verbrauch von 120,9 g Jod.

Versuch II. Titer: 1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,002505 g Jod.
Zu 25 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung = 0,011701 g Harnsäure
wurden hinzugefügt

20 ccm. Hübl'sche Jodlösung = 11,72 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung
nach 2stündiger Einwirkung
zurücktitriert

5,45 " " "

Die Differenz von 6,27 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, resp.
die dieser Lösung entsprechende Jodmenge von 0,015706 g Jod wurde
zur Veränderung der Harnsäure verbraucht; auf 100 g Harnsäure
umgerechnet, resultiert ein Verbrauch von 134,2 g Jod.

Versuch III. Nach 3stündiger Einwirkung wurden für 100 g
Harnsäure 141,68 g Jod verbraucht.

Versuch IV. Nach 17stündiger Einwirkung wurden für 100 g
Harnsäure 141,68 g Jod verbraucht.

Versuch V. Nach 22stündiger Einwirkung wurden für 100 g
Harnsäure 144,84 g Jod verbraucht.

Versuch VI. Nach 24stündiger Einwirkung wurden für 100 g
Harnsäure 150,54 g Jod verbraucht.

Versuch VII. Nach 48stündiger Einwirkung wurden für 100 g
Harnsäure 160,7 g Jod verbraucht.

II. Versuche mit concentrirten Hübl'schen Jodlösungen.

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Aus einer sorgfältig hergestellten alkalischen Harnsäure-
lösung wurden stets 50 ccm. = 0,04258 g Harnsäure ent-
nommen, mit 50 ccm. verdünnter Schwefelsäure (1 : 10) an-
gesäuert, dann 50 ccm. 96%iger Alkohol, und hierauf die
Hübl'sche Jodlösung hinzugefügt und die Lösung öfters um-
geschüttelt. Die hinzugefügte Jodmenge, welche bei allen
Versuchen die gleiche war, entsprach 39,65 ccm. Natriumthio-

sulfat (Mittel aus 3 Titrationen). Nach verschiedener Zeitdauer der Einwirkung wurde das überschüssige Jod mit Natriumthiosulfat zurücktitriert.

1 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,012763 g Jod.

Versuch I. Dauer der Einwirkung: 12 Minuten.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 36,57 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung: Die Differenz von 39,65 — 36,57 ccm. = 3,08 ccm. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, entsprechend 0,039311 g Jod, wurden zur Veränderung der verwendeten Harnsäuremenge von 0,04258 g verbraucht. Auf 100 g Harnsäure umgerechnet, resultirt ein Verbrauch von 99,84 g Jod.

Versuch II. Dauer der Einwirkung: 2 Stunden.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 35,74 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Differenz beträgt: 3,91 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,049905 g Jod. Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind erforderlich 117,2 g Jod.

Versuch III. Dauer der Einwirkung: 5 Stunden.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 35,78 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Differenz beträgt: 3,87 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,049393 g Jod. Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind erforderlich 116 g Jod.

Anmerkung: Aus den Versuchen 2 und 3 resultirt, dass zwischen der zwei- und fünfstündigen Einwirkung der Jodlösung die Veränderung der Harnsäure nicht fortschreitet.

Versuch IV. Dauer der Einwirkung: 15 Stunden.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 34,48 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Differenz beträgt: 5,17 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,06573 g Jod. Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind erforderlich 154,4 g Jod.

Versuch V. Dauer der Einwirkung: 19 Stunden.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 34 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Differenz beträgt: 5,65 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,072112 g Jod. Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind erforderlich 169,4 g Jod.

Versuch VI. Dauer der Einwirkung: 48 Stunden.

Beim Zurücktitriren verbraucht: 33,63 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die Differenz beträgt: 6,02 ccm. n_{10} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung = 0,076835 g Jod. Zur Veränderung von 100 g Harnsäure sind erforderlich 180,4 g Jod.

Aus den obigen Versuchen geht hervor, dass der Jodverbrauch — wie zu erwarten war — mit der Dauer der Einwirkung und der Stärke des Oxydationsmittels zunimmt, und dass daher in diesem Falle das von Kreidl beobachtete eigenthümliche Verhalten der Harnsäure nicht constatirt werden konnte, weil eben in Folge der Abwesenheit des Jodkaliums die bereits erwähnten secundären Prozesse nicht eintreten konnten.

Von weiteren Versuchen mit noch concentrirteren Jodlösungen habe ich aus dem Grunde Abstand genommen, weil einerseits zu concentrirte Jodlösungen leicht zu fehlerhaften Resultaten Veranlassung geben können, anderseits weil die bisherigen Versuche schon zeigen, dass selbst bei einem Verhältnisse der Jodlösungen von 1 : 2 : 20 der Jodverbrauch nur in geringem Masse zunimmt.

Aus den durchgeführten Versuchen geht des Weiteren die Thatsache hervor, dass sich auch die Hübl'sche Jodlösung zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure als nicht geeignet erweist, weil unter den eingehaltenen Bedingungen selbst nach 48stündiger Dauer der Einwirkung die Veränderung der Harnsäure noch nicht als beendet anzusehen ist.

Oxydationsversuche mit Permanganat in alkalischer Lösung.

Nachdem Hopkins die Oxydation der Harnsäure in saurer Lösung mit verdünnter Permanganatlösung studirt und darauf bekanntlich eine Methode zur quantitativen Harnsäurebestimmung gegründet hat, lag es nahe, das Verhalten der Harnsäure gegen Permanganat auch in alkalischer Lösung zu untersuchen, um eventuell — in analoger Weise wie Hopkins — einen fixen Punkt zu finden, bis zu dem die Oxydation unter gegebenen Verhältnissen fortschreitet und dessen Kenntniss die quantitative Bestimmung der Harnsäure durchzuführen gestattet.

Die diesbezüglichen Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Versuch I. Zu 50 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung, entsprechend 0,0290035 g Harnsäure, wurde bei gewöhnlicher Temperatur aus einer Bürette eine circa $n/10$ Permanganatlösung so lange unter Umschwenken hinzugefügt, bis die ganze Lösung eine deutliche Rothfärbung zeigte. Hierauf wurde mit 20 ccm. Schwefelsäure (1 : 3) angesäuert, dann 5 ccm. $n/10$ -Oxalsäure — entsprechend 10,28 ccm. KMnO_4 -Lösung — zugesetzt, gekocht, hierauf der Ueberschuss an Oxalsäure in bekannter Weise zurücktitirt.

Permanganat insgesamt zugesetzt 21,88 ccm.

Oxalsäure hinzugefügt: 5 ccm., entsprechend . 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 11,20 ccm. KMnO_4 .

Versuch II. 50 ccm. alkalischer Harnsäurelösung = 0,0290035 g Harnsäure:

Permanganat insgesamt zugesetzt 22,30 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 12,02 ccm. KMnO_4 .

Versuch III. Mit 50 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung = 0,0290035 g Harnsäure wurde der Oxydationsversuch nochmals wiederholt

Permanganat insgesamt zugesetzt 22,88 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 12,60 ccm. KMnO_4 .

Aus obigen Versuchen resultirt, dass bis zum Entstehen der deutlichen Rothfärbung circa 22 ccm. Permanganat erforderlich sind, dass aber der KMnO_4 -Verbrauch nicht genügend constant ist. Die weiteren Versuche wurden nun in der Weise durchgeführt, dass von vornherein ein wechselnder Ueberschuss an Permanganat hinzugefügt wurde; die weiteren Manipulationen waren dieselben wie bei Versuch I, nur wurde bei allen Versuchen eine bestimmte Kochdauer eingehalten.

Versuch IV. 50 ccm. alkalische Harnsäure-Lösung = 0,0290035 g Harnsäure wurden mit einem Ueberschuss an Permanganat versetzt, hierauf 5 Minuten im Kochen erhalten, dann auf circa 60° C. abgekühlt 20 ccm. Schwefelsäure (1 : 3) zugesetzt, hierauf 5 ccm. $\text{n}/_{10}$ -Oxalsäure hinzugefügt und mit Permanganat zurücktitrirt. Der Permanganatzusatz war so bemessen, dass nach dem 5 Minuten langen Kochen die Lösung noch roth gefärbt erschien.

Gesammt-Permanganatzusatz 24,81 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 14,57 ccm. KMnO_4 .

Versuch V. Derselbe Vorgang wie bei Versuch IV.

Gesammt-Permanganatzusatz 25,44 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 15,16 ccm. KMnO_4 .

Versuch VI. Derselbe Vorgang wie bei IV und V.

Gesammt-Permanganatzusatz 26,20 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 15,92 ccm. KMnO_4 .

Versuch VII. Derselbe Vorgang wie bei IV, V und VI.

Gesammt-Permanganatzusatz 27,00 ccm.

5 ccm. Oxalsäure hinzugefügt 10,28 „

Zur Oxydation der Harnsäure verbraucht . . 16,72 ccm. KMnO_4 .

Aus den obigen Resultaten ergibt sich, dass die zur Oxydation von ein und derselben Harnsäuremenge erforderlichen Cubikcentimeter Permanganat nicht constant sind, sondern dass Differenzen resultiren, die um so grösser sind, je grösser die von vornherein zugesetzte Permanganatmenge ist. Wir sehen also, dass der Oxydationsprocess nicht so verläuft, dass in gleichen Zeitintervallen gleich viel Harnsäure — *ceteris paribus* — oxydirt wird, und dass wahrscheinlich die Reaktionsgeschwindigkeit in einer gewissen Abhängigkeit zu der Concentration der Permanganatlösung stehen dürfte.

Die folgenden Versuche wurden unter constanten Bedingungen durchgeführt, d. h. auf ein und dieselbe Harnsäuremenge wurden gleiche Mengen von Permanganat einwirken gelassen und auch bezüglich der Kochdauer die gleiche Zeit eingehalten.

Herstellung der alkalischen Harnsäurelösung.

Zu 4 g einer chemisch reinen Harnsäure, deren N-Gehalt 33,3% betrug, wurde Normallauge so lange hinzugesetzt, bis sich die Harnsäure vollkommen gelöst hat, und hierauf die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt. 25 ccm. dieser Lösung enthalten genau 0,1 g Harnsäure.

Oxydationsversuche bei gleicher Kochdauer.

Versuch 1. 25 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung wurden mit 50 ccm. destillirten Wassers verdünnt, hierauf unter Umschwenken 50 ccm. einer circa $n/_{10}$ Permanganatlösung hinzugefügt, dann 5 Minuten gekocht (vom Momente der Blasenbildung an gerechnet), alsdann die Lösung mit 15 ccm. Schwefelsäure (1:3) angesäuert, eine Minute im Kochen erhalten, 10 ccm. $n/_{10}$ Oxalsäure zugesetzt, aufgeköcht, hierauf der Ueberschuss an Oxalsäure mit Permanganat zurücktitirt.

Der gesammte Zusatz an Permanganat betrug .	50,00 ccm. KMnO_4
Oxalsäure wurden hinzugesetzt 10 ccm., entsprechend	19,36 „ „
Für den Ueberschuss an Oxalsäure wurden verbraucht	7,45 „ „
Zur Oxydation von 0,1 g Harnsäure wurden somit verbraucht	38,09 ccm. KMnO_4 .

Versuch 2.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,11 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 3.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,18 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 4.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,18 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 5.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,08 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 6.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,17 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 7.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,15 ccm. KMnO_4 .		
Versuch 8.	Derselbe Versuch genau wiederholt.	Verbraucht
38,11 ccm. KMnO_4 .		

Aus diesen Versuchen ergibt sich im Mittel ein Permanganatverbrauch von 38,127 ccm. KMnO_4 oder 1 ccm. KMnO_4 oxydirt $\frac{0,1}{38,127}$ g Harnsäure, entsprechend 2,624 mg Harnsäure, d. h. zur Oxydation von 2,624 mg Harnsäure wird unter Einhaltung oben angegebener Bedingungen 1 ccm. einer Permanganatlösung verbraucht, von der jeder Cubikcentimeter 0,0027239 g Fe entspricht.

Zum Vergleiche habe ich nun Oxydationsversuche mit reiner Harnsäure in saurer Lösung nach der Hopkins-Folin'schen Methode und zwar unter genauer Einhaltung der erforderlichen Bedingungen (Temperatur und Volumenverhältnisse) durchgeführt und nachfolgende Resultate erhalten:

Titer der Permanganatlösung:

1 ccm. = 3,648 mg Harnsäure.

Für 25 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung = 0,1 g Harnsäure wurden verbraucht:

1. 27,50 ccm. KMnO_4 -Lösung.
2. 27,42 „ „
3. 27,48 „ „
4. 27,46 „ „
5. 27,44 „ „
6. 27,43 „ „

Aus diesen Versuchen ergeben sich im Mittel 27,422 ccm. Permanganat, entsprechend 100,035 mg Harnsäure. Demnach lässt sich nach der Hopkins-Folin'schen Methode in reinen Harnsäurelösungen die Harnsäure quantitativ bestimmen.

Vergleicht man den Permanganatverbrauch bei der Oxydation der Harnsäure in saurer und alkalischer Lösung, so sieht man, dass zur Oxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung — *ceteris paribus* — erheblich mehr Permanganat verbraucht wird, als in saurer Lösung.

Oxydationsversuche bei verschiedener Kochdauer.

Wurden die Oxydationsversuche so durchgeführt, wie bei dem Versuche I angegeben ist, nur mit dem Unterschiede, dass die Kochdauer bei den verschiedenen Versuchen zwischen 5 Minuten und 1 Minute ablaufend gewechselt hat, dann bewegte sich der Permanganatverbrauch zwischen 38,1 bis 34,5 ccm., d. h. es hat sich mit der Abnahme der Kochdauer der Verbrauch an Permanganat — wie vorausszusehen war — vermindert.

Einfluss von Salzen bei der Oxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung.

Bei der quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harn muss bekanntlich die Harnsäure vorerst aus dem Harne ausgefällt werden, was vortheilhaft nach der Folin'schen Methode mit essigsauerm Ammon unter nachfolgendem Auswaschen des Niederschlages von harnsauerm Ammon mit kohlsaurem Ammon geschieht.

Ich habe nun eine Reihe von Oxydationsversuchen in der Weise durchgeführt, dass ich zu je 25 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung, entsprechend 0,1 g Harnsäure, 10 ccm. einer gesättigten Lösung von kohlsaurem Ammon hinzugefügt, im Uebrigen aber die Oxydationsversuche in der bei Versuch I genau beschriebenen Weise — also auch unter Einhaltung gleicher Kochdauer — durchgeführt habe.

Für je 25 ccm. der alkalischen Harnsäurelösung wurden verbraucht:

1. 42,95 ccm. KMnO_4
2. 42,88 " "
3. 43,01 " "
4. 42,95 " "

Wir sehen somit, dass bei Gegenwart von kohlen-saurem Ammon¹⁾ der Permanganatverbrauch ein höherer ist, als bei den analogen Versuchen ohne Salzzusatz, welches Ergebniss wahrscheinlich auf Rechnung der Neutralisation der Schwefelsäure durch das kohlen-saure Ammon zurückzuführen sein dürfte.

Weitere Versuche, die ich durchgeführt habe, um die aus verschiedenen normalen und pathologischen Harnen nach Folin abgeschiedene Harnsäure durch Oxydation in alkalischer Lösung quantitativ zu bestimmen, ergaben keine genügend brauchbaren Resultate.

Fassen wir nun die bei den Oxydationsversuchen der Harnsäure in alkalischer Lösung erhaltenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich, dass der Permanganatverbrauch abhängig ist erstens von der Anzahl der hinzugefügten Cubikcentimeter Permanganatlösung, zweitens von der Kochdauer und drittens von der Gegenwart von Salzen, so dass diese Methode zur quantitativen Harnsäurebestimmung in Harnen sich nicht vortheilhaft verwerthen lässt.

1) Um mich zu überzeugen, ob nicht Spuren irgend welcher Verunreinigungen des kohlen-sauren Ammons den Mehrverbrauch an Permanganat bedingen, habe ich mit der entsprechenden Menge von kohlen-saurem Ammon einen Leerversuch gemacht, bei welchem keine Spur von Permanganat verbraucht wurde, womit auch die Reinheit des kohlen-sauren Ammons erwiesen ist.

Ueber Indikanurie in Folge von Oxalsäurewirkung.

In Gemeinschaft mit **Frl. Else von der Leyen**, cand. med.

Mitgetheilt von

Erich Harnack.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.)

(Der Redaction zugegangen am 9. Februar 1900.)

Wenn ein Fachmann für Ausführung der sogenannten Indigoreaction des Harnes sich geeignetes Material zu beschaffen wünscht, so füttert er entweder einen Hund einige Zeit ausschliesslich und reichlich mit Fleisch oder er verfüttert Indol, resp. Orthonitrophenylpropionssäure an geeignete Thiere. Es gibt indess eine andere, ungemein einfache Methode, die zum Ziele führt: man braucht nur einem Hunde, dessen Harn (bei gemischter Nahrung) indikanfrei ist, die wässerige Lösung von ca. 0,1 neutralen Natriumoxalats subcutan zu injiciren und der in den folgenden Tagen gesammelte Harn ergibt meist eine ungemein starke Indigoreaction, die auch noch mehrere Tage anzuhalten pflegt. Oxalsäure erzeugt also, selbst in ungiftiger Dosis, Indikanurie, eine Thatsache, die sich als Einzelfactum etwa dem Phloridzindiabetes an die Seite stellen lässt.

Ich habe die betreffende Beobachtung zunächst am Menschen machen können. Zufällig fand ich Gelegenheit, in einem Fall von schwerer, jedoch nicht tödtlicher Sauerklee-salzvergiftung den Harn zu untersuchen. Es hatte sich in dem Falle um Verwechslung mit Bittersalz gehandelt, und es waren bald nach der Vergiftung ausser Erbrechen auch heftige Durchfälle eingetreten, was wohl hauptsächlich das Leben

rettete. Als ich den Harn, der frisch gelassen war, zur Untersuchung erhielt, waren bereits ca. 3 Wochen nach der Vergiftung verflossen und die betreffende Person als Reconvalescentin zu bezeichnen. Der Harn war hell, verdünnt, eher reichlich als spärlich, enthielt auch noch viel Kalkoxalat als Sediment, was nach so langer Zeit bemerkenswerth ist. Da bei der Patientin noch immer Störungen der Darmthätigkeit vorhanden waren, kam ich beiläufig auf die Idee, eine Indikanprobe vorzunehmen, und erhielt eine auffallend starke Reaction. Dies führte mich auf den Gedanken, den Sachverhalt experimentell zu prüfen; die bezüglichen Versuche an Thieren sind dann von Frl. von der Leyen unter meiner Leitung ausgeführt worden.

Da die Oxalsäurevergiftung beim Menschen stets durch Einführung des Giftes per os geschieht und entweder durch die freie Säure oder, wie im obigen Falle, durch ein saures Salz zu Stande kommt, so musste zunächst die Frage aufgeworfen werden, ob es sich nicht um eine Folge der Säurewirkung im Darm handle, d. h. ob nicht jede beliebige Mineralsäurevergiftung ebenfalls Indikanurie erzeuge. Nach den bekannten, für die Indikanfrage grundlegenden Untersuchungen von Jaffé steht die Menge des Harnindikans in direkter Beziehung zu der Intensität der Fäulnisprocesse im Darm, die als Produkt der Eiweissfäulnis Indol ergeben. Je mehr Eiweiss im Darm der Fäulnis anheimfällt, umso mehr Indikan tritt im Harn auf. Deshalb findet man auch umso mehr davon im Harn, je ausschliesslicher und reichlicher mit Fleisch gefüttert wird. Andererseits hat erst kürzlich von Limbeck¹⁾ darauf hingewiesen, wie sehr durch die Säurewirkung im Darm die Resorption des Darminhaltes beeinträchtigt werden kann. Je länger aber die Verdauungsprodukte im Darm verweilen, in um so höherem Grade können sie der Fäulnis anheimfallen. Allerdings ist man nach der anderen Seite hin wieder zu der Annahme einer gewissen fäulniswidrigen, antiseptischen Wirkung der freien Säuren berechtigt, wenigstens in Hinsicht auf die

1) v. Limbeck, Zeitschr. f. klin. Med. 1898, Bd. 34, S. 419.

normale Magensäure; denn wo diese fehlt, nimmt die Menge der gepaarten Schwefelsäuren im Harn zu.¹⁾ Dem gegenüber darf wieder nicht unberücksichtigt bleiben, dass ein erheblicher Theil der in den Magen gebrachten freien verdünnten Säuren ziemlich rasch resorbirt zu werden scheint. Dazu kommt, dass nach den Untersuchungen von Blumenthal²⁾ der Alkaligehalt in einem faulenden Gemisch auf die Menge der einzelnen Fäulnisprodukte, welche entstehen, von Einfluss ist: bei geringerem Alkaligehalt sah er mehr Indol, bei grösserem mehr saure Fäulnisprodukte gebildet werden. Es war demnach für uns gegeben, zunächst zu ermitteln, ob auch durch Einführung einer beliebigen Mineralsäure in den Magen eine Indikanurie erzeugt wird und wie sie sich zu der durch Oxalsäure erzeugten verhält.

Wir begannen unsere Versuche am Kaninchen, gaben aber dieses Thier sehr bald auf; wir erhielten mit dem normalen Kaninchenharn niemals eine Indigoreaction, aber auch bei Oxalsäurewirkung gelang es uns nur einmal, eine allerdings sehr deutliche Reaction zu beobachten. Das Kaninchen ist im Allgemeinen zur Ausscheidung von Harnindikan wenig geneigt. Das haben schon Andere vor uns beobachtet: so gibt Rosin³⁾ an, im Kaninchenharn niemals Indigoroth gefunden zu haben, und Peurosch⁴⁾ konnte das Indikan im Harn von Kaninchen nur bei Fütterung mit frischem Fleisch und bei Grasfütterung, gar nicht bei Fütterung mit Hafer, Kartoffeln, Stärke, Zucker u. s. w. nachweisen. Es kommt also augenscheinlich auch bei Kaninchen auf die Qualität der Nahrung an; denn unfähig zur Indikanausscheidung sind sie keineswegs; wie ja auch Hoppe-Seyler⁵⁾ das Indikan gerade aus dem Harn von

1) Vgl. Ziemke, Ueb. d. Einfl. d. Salzsäure des Magensafts auf die Fäulnisvorgänge im Darm. Diss. Halle 1893 (unter v. Mering's Leitung). — Simon, Centralbl. f. innere Med. Bd. 17, S. 203.

2) Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Med. 1895, Bd. 28, S. 17.

3) Rosin, Virchow's Archiv, Bd. 123, S. 519, 1891.

4) Peurosch, Diss. Königsberg 1877 (citirt nach Hoppe-Seyler, physiol. Chemie, S. 842).

5) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1883, Bd. VII, S. 420 ff.

Kaninchen, die mit Orthonitrophenylpropionsäure gefüttert waren, isolirt hat.

Da sich uns der Hund als viel brauchbarer erwies, wurden die folgenden Versuche nur an diesem Thiere an- gestellt. Es sei hier aber gleich auf einen wichtigen Punkt nochmals hingewiesen. Unsere Hunde wurden mit Hunde- kuchen (Spratt's Patent) gefüttert, in denen die vegetabilische Nahrung überwiegt. Unter diesen Umständen war der normale Harn der Thiere fast stets indikanfrei. Füttert man dagegen den Hund ausschliesslich und reichlich mit frischem Fleisch, so gibt der normale Harn des Thieres meist schon eine so starke Indigoreaction, dass die Wirkung der Oxalsäure nicht so ins Auge fallen kann.

Die Indigoreaction wurde in Proben des zu unter- suchenden Harnes stets mit Hilfe zweier Methoden, der von Jaffé angegebenen (HCl, Liquor Natrii hypochlorosi und Schütteln mit Chloroform) und der von Obermayer modi- ficirten (Gemisch von sehr starker HCl mit Eisenchlorid und Schütteln mit Chloroform) ausgeführt. Wir möchten fast der ersteren, bei vorsichtiger Anwendung des Chlors (um nicht zu stark zu oxydiren), den Vorzug einräumen; denn bei Ab- wesenheit von Indikan bleibt nach dem Schütteln die Chloro- formschicht ganz farblos, wenn Jaffé's Methode angewendet wird, während sie sich bei der Ausführung nach Obermayer leicht in ein schmutziges Hellgrau verfärbt. Neuerdings hat übrigens Amann empfohlen, sich bei der Indigoreaction an Stelle der anderen Oxydationsmittel des Natriumpersulfates zu bedienen. Glücklicher Weise waren in unseren Versuchen die positiven Ergebnisse immer so evident und die Unterschiede so handgreiflich, dass die Wahl der einen oder anderen Methode eigentlich ohne Belang gewesen wäre und wir auch keine Veranlassung hatten, das Indikan im Harn quantitativ zu bestimmen, wofür ja massanalytische Methoden angegeben sind. Wir theilen nun zunächst eine Anzahl von Versuchen in Kürze mit.

I. Versuch.

Kaninchen von 3500 g. Indigoreaction im Harn völlig negativ.

23. XI. Injection von 0,1 neutralen Natriumoxalats subcutan.
24. XI. Schwache Indigoreaction im Harn.
Injection von 0,15 Natriumoxalat subcutan.
25. XI. Harn dunkelgelb, trüb, specifisches Gewicht 1025, zeigt starke Indigoreaction.
27. XI. Befinden ungestört, Harn frei von Indikan, specifisches Gewicht 1026.
Injection von 0,2 Natriumoxalat subcutan.
28. XI. Harn dunkelorange gelb, specifisches Gewicht 1027, zeigt keine Indigoreaction.
29. XI. Harn reichlich, specifisches Gewicht 1020, zeigt Spuren von Indikan.
30. XI. Harn frei von Indikan, specifisches Gewicht 1016.

NB. Es war das, wie oben erwähnt, der einzige Fall, in dem wir beim Kaninchen eine deutliche Wirkung beobachten konnten.

II. Versuch.

Hund von 4150 g. Indigoreaction im Harn völlig negativ.

23. XI. Lösung von 1,0 freier Oxalsäure in den Magen gebracht.
24. XI. Schwache Reaction auf Indigo.
Lösung von 1,5 freier Oxalsäure in den Magen gebracht.
25. XI. Das Thier hat zweimal erbrochen. Harn gibt schwache Indigoreaction, specifisches Gewicht 1015.
27. XI. Sehr starke Indigoreaction, specifisches Gewicht 1016. Allgemeinbefinden gestört.
28. XI. Sehr starke Indigoreaction, specifisches Gewicht 1021. Allgemeinbefinden ungünstig.
29. XI. Tod des Thieres.

III. Versuch.

Hund von 3950 g. Indigoreaction im Harn kaum sichtbar.

30. XI. 1,0 concentrirte Schwefelsäure in 15 ccm. Wasser in den Magen gebracht.

Datum	Befinden des Thieres	Aussehen des Harns	Menge des Harns	Specifisches Gewicht	Indigoreaction
1. XII.	hat erbrochen	stark bluthaltig	gering	1023	—
2. XII.	gut	goldgelb klar	»	1034	stark
4. XII.	»	orange gelb trüb	»	1034	»
5. XII.	»	»	»	1027	schwach
7. XII.	»	trübe	»	1039	sehr schwach

IV. Versuch.

Hündchen von 2050 g. Indigoreaction im Harn kaum sichtbar.
28. XI. Lösung von 0,4 freier Oxalsäure subcutan injicirt.¹⁾

Datum	Befinden des Thieres	Aussehen des Harns	Menge des Harns	Specificisches Gewicht	Indigoreaction
28. XI.	gut	dunkelgelb	—	1030	sehr gering
29. XI.	mässig	hellgelb	reichlich	1012	sehr stark
30. XI.	»	blassgelb	»	1013	»
1. XII.	besser	blassgelb, klar	»	1011	»
2. XII.	mässig	hellgelb, trüb	»	1013	»
4. XII.	schlecht	» »	»	1013	stark
5. XII.	»	hellgelb	»	1017	»

Nekrotisirung der Injectionsstelle. Tod des Thieres.

V. Versuch.

Hund von Versuch III. Indigoreaction im Harn kaum sichtbar.
7. XII. Injection von 0,1 neutralen Natriumoxalats subcutan.

Datum	Befinden des Thieres	Aussehen des Harns	Menge des Harns	Specificisches Gewicht	Indigoreaction
7. XII.	gut	dunkelgelb	wenig	1039	sehr schwach
8. XII.	»	hellgelb, klar	245 ccm.	1011	sehr stark
9. XII.	»	» »	100 »	1025	»
10. XII.	Appetit schwach	» »	100 »	1030	stark
11. XII.	»	dunkelgelb, klar	55 »	1044	sehr schwach
12. XII.	»	» »	58 »	1039	negativ
12. XII. Injection von 0,008 Natriumoxalat subcutan.					
13. XII.	appetitlos	dunkelgelb, klar	54 ccm.	1045	negativ
14. XII.	»	» »	83 »	1045	»

¹⁾ Durch ein Versehen wurde statt des neutralen Salzes die freie Säure subcutan injicirt, daher die Nekrotisirung.

Bei demselben Thier vermochten auch subcutane Injectionen von 0,02 und 0,04 neutralen Natriumoxalats keine Indikanurie zu bewirken. Das Thier ging bald darauf zu Grunde, wahrscheinlich doch noch an den Folgen der Schwefelsäurevergiftung (Versuch III).

VI. Versuch.

Grosser Hund von 13050 g. Indigoreaction im Harn negativ.

7. XII. Lösung von 0,3 neutralen Natriumoxalats in den Magen gebracht.

Datum	Befinden des Thieres	Ansehen des Harns	Menge des Harns	Specificsches Gewicht	Indigoreaction
7. XII.	gut	hellgelb, klar	gering	1026	—
8. XII.	„	dunkelgelb	225 ccm.	1048	gering
9. XII.	„	„	480 „	1031	deutlich
10. XII.	„	goldgelb, klar	190 „	1030	sehr schwach
11. XII.	„	dunkelgelb, klar	100 „	1062	„ „
12. XII.	„	dunkelgelb, trüb	220 „	1042	kaumsichtbar
13. XII.	„	dunkelgelb, klar	135 „	1063	negativ

VII. Versuch.

Derselbe Hund.

14. XII. 0,3 concentrirte Schwefelsäure in 15 g Wasser in den Magen gebracht.

Datum	Befinden des Thieres	Ansehen des Harns	Menge des Harns	Specificsches Gewicht	Indigoreaction
14. XII.	gut	dunkelgelb, klar	105 ccm.	1068	—
15. XII.	„	„ „	170 „	1038	gering
16. XII.	„	ziemlich klar	350 „	1034	spurenhaft

16. XII. 0,6 concentrirte Schwefelsäure in 24 g Wasser in den Magen gebracht.

17. XII.	gut	gelb, klar	570 ccm.	1019	sehr stark
18. XII.	„	dunkelgelb, klar	250 „	1033	spurenhaft

VIII. Versuch.

Derselbe Hund.

15. I. Injection von 0,06 neutralen Natriumoxalats subcutan.

Datum	Befinden des Thieres	Aussehen des Harns	Menge des Harns	Specificisches Gewicht	Indigoreaction
15. I.	gut	dunkelgelb	250 ccm.	1043	spurenhaf
16. I.	„	heller gelb	280 „	1027	sehr stark
17. I.	„	dunkelgelb	250 „	1035	mässig
18. I.	„	dunkelgelb, klar	420 „	1016	sehr deutlich
19. I.	„	„ „	300 „	1027	deutlich
20. I.	„	dunkelgelb	130 „	1036	„

IX. Versuch.

An einem Hunde wurde nachzuweisen versucht, ob die Oxalsäure auch im Hungerzustand Indikanurie erzeugt, aber die nur durch einige Tage fortgesetzte Inanition führte selbst eine so starke Indikanurie herbei, dass sich eine Wirkung der Oxalsäure nicht mehr deutlich feststellen liess.

Aus den obigen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ableiten:

1. Indikanurie wird sowohl durch Vergiftung mit verdünnter Schwefelsäure (in $2\frac{1}{2}$ —6%iger Lösung) als auch durch Einführung von Oxalsäure per os erzeugt, aber es bedarf im ersteren Falle grösserer Dosen und die Indikanurie ist viel weniger anhaltend.

2. Um durch Oxalsäure Indikanurie hervorzurufen, ist es weit zweckmässiger, die Oxalsäure in Form ihres neutralen Natriumsalzes subcutan beizubringen, und zwar genügen hierzu schon relativ sehr kleine Dosen (bei einem starken Hunde nur 0,06 neutralen Natriumoxalates!), also Mengen, die im Uebrigen als ungiftig bezeichnet werden müssen.

Diese letztere Thatsache ist jedenfalls die beachtenswertheste, wenn es sich darum handelt, die Frage zu entscheiden, wie und auf welchem Wege eigentlich die Indikanurie

durch Oxalsäure erzeugt wird. Die Anschauung, dass es sich dabei lediglich um die Folgen einer Darmwirkung handle, wird dadurch doch zum Mindesten sehr unwahrscheinlich gemacht. Es ist ja natürlich nicht ausgeschlossen, dass von den 4 cg Oxalsäure, die etwa in 6 cg Oxalat enthalten sind, ein gewisser Bruchtheil durch den Magen oder Darm ausgeschieden wird, wie es ja auch bei zahlreichen anderen subcutan beigebrachten Substanzen geschieht (obschon die Hauptausscheidung der Oxalsäure erfahrungsgemäss durch die Nieren stattfindet), aber dass so kleine Mengen genügen sollten, um eine gesteigerte Eiweissfäulniss im Darm zu veranlassen, kann doch kaum vermuthet werden. Die Hunde, die so geringe Quantitäten subcutan erhielten, blieben gesund; weder Appetitverlust noch irgend welche sonstige Zeichen von Störung der Darmfunctionen konnten beobachtet werden. Thatsächlich waren ja auch zur Erzeugung der Indikanurie bei Einführung der Oxalsäure per os weit grössere Mengen erforderlich, wobei man freilich wieder berücksichtigen muss, dass die Oxalsäure sehr rasch, wohl schon vom Magen aus theilweise, resorbirt wird.

Die Annahme liegt doch wohl näher, dass die Indikanurie der Ausdruck einer durch die Oxalsäure bedingten Stoffwechselstörung sei. Damit würde eventuell der Beweis geliefert, dass für das Harnindikan die Eiweissfäulniss im Darm nicht nothwendig die einzige Quelle zu bilden braucht. Es fragt sich demnach erstens, ob man der Oxalsäure solche Stoffwechselwirkungen zutrauen darf, und zweitens, ob sich für die Annahme, dass das Harnindikan auch als Produkt von Stoffwechselstörungen aufzutreten vermag, irgend etwas Stichhaltiges anführen lässt.

Dass die Oxalsäure als Protoplasmagift anzusehen sei, ist eine ziemlich weit verbreitete Auffassung, die man theoretisch durch die Annahme einer besonderen Wirkung auf die Kalksalze des Protoplasmas zu stützen versucht hat. Für den Eintritt nicht unerheblicher Veränderungen des Stoffwechsels spricht vor Allem die typische Veränderung, die die Beschaffenheit des Harnes erleidet. Soweit nicht durch Oxalatinfarkt der Nieren Anurie erfolgt, wird der Harn stets

verdünnter, heller, von geringerem specifischen Gewicht. Das hat schon A. Fränkel¹⁾ vollkommen richtig beschrieben, und dasselbe konnten wir am Menschen wie an den Versuchsthiereu ausnahmslos beobachten, und zwar bei letzteren auch nach kleinen ungiftigen Dosen. Die Menge des Harns ist dann eher vermehrt als vermindert, wenn man auch nicht gerade von einer deutlichen und constanten diuretischen Wirkung sprechen kann. Diese typische Veränderung in der Beschaffenheit des Harnes, die neben der Indikanurie eigentlich das einzige Symptom der Wirkung kleiner ungiftiger Dosen bildet und die, ebenso wie die Indikanurie, auch merkwürdig lange nachdauert, ist doch wohl geeignet, auf gewisse Veränderungen hinzuweisen, die der Stoffwechsel durch die Oxalsäure erleidet.

Einen direkten Beweis für solche Wirkungen haben die Versuche von H. Meyer²⁾ über die Blutalkalescenz ergeben: er beobachtete, dass selbst nach Einführung des neutralen Natriumoxalats der Kohlensäuregehalt des Blutes auf die Hälfte herabging. Die angewendeten Dosen waren vergiftende (0,2—0,3 subcutan bei der Katze). Hier liegt also augenscheinlich eine direkte oder indirekte Säurewirkung vor, aus der man auf eine «oxydationshemmende» Wirkung mit gleichzeitiger Erzeugung abnormer Spaltungsvorgänge schliessen könnte. Jedenfalls wird eine nicht unerhebliche Beeinflussung des Stoffumsatzes dadurch erwiesen. Auch die bei der Oxalsäurevergiftung wiederholt beobachtete Erniedrigung der Körpertemperatur wäre in gleichem Sinne zu verwerthen.

Noch wichtiger freilich würde eine Beobachtung sein, die von verschiedenen Autoren, namentlich von Kobert und Küssner,³⁾ Krohl⁴⁾ u. A. gemacht worden ist, wonach die Oxalsäure einen Diabetes mellitus erzeugen soll. Die That-

1) A. Fränkel, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 2, Heft 3.

2) H. Meyer und Feitelberg, Archiv f. exper. Pathol. und Pharm., Bd. 17, S. 304.

3) Kobert und Küssner, Virchow's Archiv, Bd. 78, S. 209; Bd. 81, S. 383.

4) Krohl, Arbeiten des pharmakolog. Instituts zu Dorpat, Bd. 7, S. 130. 1891.

sache wäre um so beachtenswerther, als nach mehrfach gemachten Erfahrungen ein gewisser Zusammenhang zwischen Melliturie und Indikanurie zu bestehen scheint, wenigstens die letztere bei Diabetikern nicht selten beobachtet worden ist und auch Oxalurie bei Diabetikern häufig vorkommen soll. Leider ist es uns jedoch bisher noch nie gelungen, uns von dem Vorhandensein eines Oxalsäurediabetes zu überzeugen. Der Harn unserer Versuchsthiere drehte auch nicht einmal spurenweise, desgleichen ergab die Reductionsprobe ein negatives Resultat. Mit dem charakteristisch niedrigen specifischen Gewicht (cf. oben) des Oxalsäureharnes stimmt eigentlich auch der vermeintliche Diabetes wenig überein. Hier finden sich also schwer vereinbare Widersprüche in der Beobachtung. Lewin¹⁾ gibt in seinem Lehrbuch der Toxikologie an, der Oxalsäurediabetes komme bei Thieren häufiger als beim Menschen vor. Dagegen konnten Caspari und v. Nathusius, die unter Zuntz' Leitung gearbeitet haben, bei Pflanzenfressern (Kaninchen, Schaf) niemals auch nur eine Andeutung von Diabetes beobachten, selbst wenn die Oxalsäure wochenlang gefüttert und eine chronische Vergiftung erzeugt wurde. Wohl aber hat Caspari²⁾ dabei einen neuen Beweis für die Gewebswirkung der Oxalsäure geliefert; denn er sah bei der chronischen Vergiftung eine sehr auffallende Affection der Knochen, die unter starkem Kalkverlust nach Art einer Rhachitis erkrankten. Auch bei Hunden scheint nach Caspari's und nach unseren eigenen Beobachtungen der Harn nach Darreichung von Oxalsäure auffallend kalkreich zu sein, was ja auch in Hinsicht auf den eventuellen Oxalatinfarct der Nieren begreiflich ist.

Gegenüber den vorliegenden positiven Angaben, namentlich den Beobachtungen von Krohl,³⁾ der den Zucker durch

1) Lewin, Lehrb. d. Toxikolog., 2. Aufl., 1897, S. 189.

2) Caspari, Ueber chronische Oxalsäurevergiftung. Diss., Berlin 1895 (Leipziger Dissert.). cf. bes. S. 8.

3) Krohl (a. a. O.) scheint seine Harnе auf ihr Drehungsvermögen nie geprüft zu haben, auch nicht auf ihr specifisches Gewicht, gibt aber wiederholt einen positiven Ausfall der Gährungsprobe an.

die Gährungsprobe nachgewiesen zu haben angibt und den Diabetes als erstes und constantestes (sic!) Symptom der Oxalsäurevergiftung bei Pflanzen- und Fleischfressern (Katze) bezeichnet, beweisen die negativen Ergebnisse zunächst nur soviel, dass der Diabetes jedenfalls nicht als constantes Symptom bei dieser Vergiftung vorkommt und noch viel weniger die Todesursache bei chronischer Oxalsäurevergiftung bilden kann.

Wir sind bemüht gewesen, uns davon zu überzeugen, ob sich nicht die Sache hier ähnlich wie beim Kohlenoxyddiabetes verhalten könnte, nämlich, dass die Qualität der Nahrung darauf von Einfluss wäre (Straub-Rosenstein). Wir fütterten daher den Hund von Versuch VI eine Zeit lang sehr reichlich nur mit frischem Fleisch und injicirten dann subcutan 0,2 g Natr. oxal., also die mehr als dreifache Dosis, die zur Erzeugung einer sehr starken Indikanurie hingereicht hatte. Aber der daraufhin gesammelte Harn, der alle Merkmale des Oxalsäureharns zeigte, drehte auch nicht einmal spurenweise und reducirte nur in der Art, wie es jeder Harn thut, der reichlich Kreatinin etc. enthält. Zucker war also nicht vorhanden.

Krohl bringt den Oxalsäurediabetes mit der Verringerung der Blutalkalescenz in Zusammenhang. So einfach liegt aber die Sache doch nicht, da z. B. Schwefelsäurevergiftung keinen Diabetes zur Folge hat.

Wie es nun auch mit dem vermeintlichen Oxalsäurediabetes bestellt sein mag, jedenfalls kann es keinem Zweifel unterliegen, dass man der Oxalsäure nicht bloss Einwirkungen auf den Stoffwechsel zutrauen darf, sondern dass solche schon nach verschiedenen Richtungen hin beobachtet und bekannt geworden sind. Der Gedanke, die Indikanurie lediglich als Folge der durch Oxalsäure erzeugten Nierenaffectio anzusehen, wie sie von Kobert und Küssner, Fränkel, Mürset¹⁾ u. A. beschrieben worden ist, hat wohl wenig Wahrscheinlichkeit für sich.

¹⁾ Mürset, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 19, S. 310.

Nicht so leicht ist die Frage mit Sicherheit zu entscheiden, ob für das Harnindikan die Eiweissfäulniss im Darm nothwendig die einzige Quelle bildet, oder ob nicht die Vorstufe des Indikans, das Indol, auch unter anderen Umständen als Spaltungsprodukt aus dem Eiweiss hervorgehen kann. Letzteres müsste eventuell bejaht werden, sobald man die Indikanurie durch Oxalsäure als Ausdruck einer Stoffwechselstörung und nicht einer blossen Darmwirkung ansieht. Dass aromatische Komplexe, wie das Indol, Skatol etc., sich aus dem Eiweiss nicht nur bei der Fäulniss, sondern auch bei anderweitigen Zersetzungs Vorgängen abspalten, ist allerdings bekannt: so erhielten Kühne,¹⁾ Nencki²⁾ u. A. dieselben auch beim Erhitzen von Eiweiss mit schmelzendem Kalihydrat, aber damit ist noch nicht sicher erwiesen, dass analoge Zersetzungen, abgesehen von der Fäulniss, auch im Organismus möglich sind. Von vorneherein wäre natürlich ein solcher Vorgang sehr wohl denkbar.

Die Frage, ob für das Harnindikan die Darmfäulniss die einzige Quelle bilde oder nicht, ist schon vielfach umstritten worden. Einmal im Hinblick auf die im Hungerzustand meist in sehr deutlicher Weise auftretende Indikanurie, von der wir uns ja auch überzeugen konnten (cfr. Versuch IX). Während Salkowski, Jaksch u. A. der Meinung waren, dass das Indol auch als Produkt eines abnormen Eiweisszerfalles in den Körpergeweben hervorgehen könne, suchte z. B. Müller³⁾ nachzuweisen, dass auch für die durch Inanition veranlasste Indikanurie die Darmfäulniss die einzige Quelle bilde.

Weitere Beobachtungen wurden gesammelt über das Auftreten von Indikanurie bei lokalen Vereiterungsheerden, und zwar auch solchen ausserhalb des Darmes. In dieser Hinsicht sind namentlich die Mittheilungen von Keilmann,⁴⁾

1) Kühne, Berichte d. deutsch. chem. Ges., Bd. 8, 1875, S. 206.

2) Nencki, ebendasselbst, Bd. 8, S. 336.

3) Müller, Mittheil. aus der Medicin. Klinik zu Würzburg, 2, 341.
— Berlin. klin. Wochenschrift 1887, Nr. 24. (Maly's Jahresber. 16, 210. 17, 279).

4) Keilmann, in Maly's Jahresber., 23, 595.

Testi¹⁾ u. A. zu nennen, denen gegenüber wieder Beckmann²⁾ die Ansicht verfocht, dass der Darm die einzig sichere Quelle für die Indolbildung sei. Weil der irgendwo angesammelte Eiter leicht der Fäulniss verfällt, so ist es natürlich schwierig, die Fäulniss als Quelle hier ganz auszuschliessen.

Da indess von zahlreichen Beobachtern (Senator,³⁾ Rosenbach,⁴⁾ Concetti⁵⁾ u. A.) Indikanurie als Begleiterscheinung vieler sehr verschiedener Erkrankungen, besonders auch des Kindesalters, und zwar von Krankheiten, die mit dem Darm an sich gar nichts zu thun haben, erkannt wurde, so gelangten diese Autoren zu der Ansicht, dass das Indol entweder durch Zerfall des resorbierten Eiweisses in den grösseren Drüsen und Geweben oder auch durch abnormen Zerfall von Gewebseiweiss, also durch Stoffwechselstörungen, entstehen müsse.

Eine sehr bemerkenswerthe Thatsache ist ferner die, dass man bei Diabetikern sowohl Oxalurie wie Indikanurie⁶⁾ nicht selten beobachtet hat, und auch hier kann die Frage aufgeworfen werden, ob es sich bei der Indikanurie um vermehrte Eiweissfäulniss im Darm oder um den Ausdruck einer Stoffwechselstörung handelt. Ersteres wäre schon deswegen nicht ganz von der Hand zu weisen, weil Diabetiker in ihrer Nahrung meist sehr beträchtliche Mengen von Fleisch zu geniessen pflegen. Andererseits ist es aber von hohem Interesse, dass, wie Tenbaum⁷⁾ nachgewiesen hat, für den Diabetes, namentlich in hochgradigen schweren Fällen, eine bedeutende Steigerung der Kalkausscheidung im Harn charakteristisch ist. Das deutet doch auf abnormen Gewebszerfall entschieden hin. Die Combination von Indikanurie und Kalkverlust⁸⁾ findet sich bei Diabetes, wie bei der Oxalsäure-

1) Testi, Centralbl. f. innere Med., 16, Nr. 51.

2) Beckmann, in Maly's Jahresber., 24, 635.

3) Senator, Medicin. Centralbl. 1877, Nr. 20 ff.

4) Rosenbach, in Maly's Jahresber., 23, 595.

5) Concetti, La pediatria, 1898, Nr. 1 f. (Maly's Jahresber. 28, 792).

6) Vgl. namentlich: Otto, Pflüger's Archiv, Bd. 33, S. 607.

7) Tenbaum, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 33, S. 379.

8) cfr. oben Caspari, a. a. O.

wirkung. Aber die nämliche Combination hat bemerkenswerther Weise Senator¹⁾ schon im Jahre 1877 in vielen anderen pathologischen Fällen beobachtet. In zahlreichen, sehr verschiedenartigen Krankheiten, in denen er eine Indikanurie nachwies, beobachtete er gleichzeitig erheblich gesteigerte Kalkausscheidung. Das weist doch nahezu mit Sicherheit auf abnormen Zerfall von Gewebseiweiss hin und lehrt auch die Indikanurie etc. durch Oxalsäure als Folge einer Gewebswirkung und Stoffwechselstörung ansehen.²⁾

Auch hier haben wir demnach wieder ein werthvolles Beispiel für Analogien zwischen den bei Krankheiten und bei Vergiftungen obwaltenden Verhältnissen vor Auge. Kaum eine andere Quelle war in neuerer Zeit für die Pathologie ergiebiger als die Toxikologie, und sie wird es in um so höherem Grade werden, je mehr wir uns bemühen, die Vergiftungen eingehend zu erforschen. Die Einzelthatsache, dass Oxalsäure Indikanurie erzeugt, gewinnt unter diesem Gesichtspunkte eine wesentlich erhöhte Bedeutung. Dazu kommt noch der wichtige Umstand, dass bekanntlich die Oxalsäure selbst als abnormes Stoffwechselprodukt auftreten kann und das krankhaft entstandene Produkt seinerseits eventuell weitere Giftwirkungen hervorzurufen und abnorme chemische Vorgänge im lebenden Körper zu veranlassen vermag. Es wird von besonderem Interesse sein, künftig festzustellen, ob auch die pathologische Oxalurie stets von Indikanurie begleitet ist.

Wir halten es also, um nochmals zusammenzufassen, für in hohem Grade wahrscheinlich, dass die durch Oxalsäure erzeugte Indikanurie nicht auf einer Darm-, sondern einer Gewebs-, bezw. Stoffwechselwirkung beruht, und selbst von der durch Schwefelsäurevergiftung veranlassten Indikanurie muss es zum Mindesten als fraglich erscheinen, ob sie lediglich auf eine Darmwirkung zurückzuführen ist.

¹⁾ Senator, a. a. O.

²⁾ Es sei mir indess gestattet, darauf hinzuweisen, dass Jaffé selbst nach einer mir gewordenen freundlichen persönlichen Mittheilung die obigen auf die Indikanurie bezüglichen pathologischen Thatsachen nicht für beweiskräftig ansieht.

Wir werden bemüht bleiben, durch weitere Versuche womöglich Material zur Entscheidung dieser Frage zu gewinnen, für jetzt würden wir die Aeusserung von Vermuthungen über die Entstehungsweise der Oxalsäure-Indikanurie für verfrüht halten. Es wäre sogar die Möglichkeit vorhanden, dass für das Indol die Darmfäulniss die einzige Quelle bildete und die Indikanurie durch Oxalsäure doch auf einer Stoffwechselwirkung der letzteren beruhte. Das würde aber zur Voraussetzung haben, dass der normale Organismus die Fähigkeit besässe, einen beträchtlichen Theil des resorbirten Indols oxydativ zu zerstören, und dass diese Fähigkeit des Körpers durch die Oxalsäure aufgehoben oder geschwächt würde. Erwägt man aber das Verhalten anderer aromatischer Complexe im Körper, so erscheint eine solche Fähigkeit des letzteren zur Indolzerstörung nicht gerade als glaubhaft.

Nachtrag.

Bei der Fortsetzung der Versuche sind uns zwei Fälle am Hunde vorgekommen, wo der Erfolg nach der subcutanen Injection des neutralen Oxalats scheinbar ein negativer war. Es hat sich aber bei genauerer Untersuchung herausgestellt, dass erstens die erforderlichen Dosen (was schliesslich bei allen Wirkungen mehr weniger der Fall ist) individuellen Schwankungen unterliegen, und dass zweitens der Erfolg in einem Theil der Fälle erst sehr verzögert als Nachwirkung, d. h. erst nach mehreren Tagen eintreten, dann aber doch noch ungemein stark und anhaltend sein kann, ein Umstand, der eigentlich auch nicht für eine Darmwirkung spricht. Wir wollen einen solchen Versuch hier noch kurz mittheilen.

Hund (von Versuch 9) wurde nach der Hungerperiode wieder 14 Tage mit Hundekuchen gefüttert, so dass der Harn indikanfrei war. Das Thier erhielt am 17. II. 0,2 Natr. oxalic. subcutan, am 20. II., wo kein Erfolg bemerkbar war, 0,15 und am 22. II., wo ebenfalls noch kein Erfolg eingetreten war, 0,3 Natr. oxalic. subcutan. Am 23. II. zeigten sich leichte Störungen des Befindens, aber erst der vom 24. bis

26. II. gesammelte Harn ergab eine sehr starke Indikanreaction, die dann auch noch, obschon die Krankheitserscheinungen zurückgingen, einige Tage nachdauerte. Der Appetit hatte natürlich zeitweilig gelitten, doch war von Inanition nicht die Rede.

Zu leugnen ist also nicht, dass man zuweilen Dosen braucht, die schon als krankmachende bezeichnet werden müssen. Jedenfalls wird man gut thun, in allen Fällen nach der Beibringung der Oxalsäure den Harn längere Zeit zu sammeln und zu prüfen, falls nicht schon am zweiten oder dritten Tage der Erfolg handgreiflich ist.

Bemerkt sei noch, dass auch im obigen Falle der Harn keinen Zucker enthielt, obschon er alkalische Kupferlösung beim Kochen entfärbte.

Warum die Empfindlichkeit gegen jene Wirkung des Oxalats in einzelnen Fällen eine so verschiedene sein kann, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Jedenfalls benutze man Hunde, deren Harn möglichst indikanfrei ist, also weder Hungerthiere noch solche, die ausschliesslich mit frischem Fleisch gefüttert werden. Bei Anwendung der Obermayer'schen Reactionsmethode fälle man den Harn erst durch vorsichtigen Zusatz einer gesättigten Bleiacetatlösung und schüttele das Filtrat nach dem Versetzen mit dem Reagens mit wenig Chloroform sehr anhaltend. Versäumt man diese Massregeln, so kann der Ausfall der Reaction sehr täuschend sein, aber auf diese Weise ausgeführt, ist die Methode doch der Jaffé'schen vorzuziehen, bei der man leicht entweder zu wenig oder zu viel Chlor verwendet.

Halle a. S. im Februar 1900.

Ueber eine neue zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harne.

Von

Dr. Adolf Jolles,

Docent am k. k. technologischen Gewerbemuseum in Wien.

Mit einer Abbildung.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. Max und Dr. Adolf Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 12. Februar 1900.)

Die wegen ihrer Einfachheit vielfach angewendete Methode von Heintz, welche auf der Ausfällung der Harnsäure mit Salzsäure beruhte, hat heute wohl nur noch ein historisches Interesse, nachdem wir wissen, dass diese Methode ganz unzuverlässige Resultate liefert und bei geringen Harnsäurequantitäten überhaupt nicht anwendbar erscheint.¹⁾ Auch die massanalytischen Methoden von J. B. Haycraft²⁾ und F. Czapek,³⁾ welche im Wesentlichen auf der Fällung ammoniakalisch gemachten Harnes mit Silberlösung beruhen (nur mit dem Unterschiede, dass Haycraft das Silber in dem Niederschlage nach Volhard bestimmt, während Czapek den in Lösung verbliebenen Rest einer zum Füllen der Harnsäure verwendeten bekannten Silbermenge titrimetrisch bestimmt), sind zur Bestimmung der Harnsäure im Harne nicht geeignet,

¹⁾ E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIV, S. 31.

²⁾ Die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harne, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1886.

³⁾ Eine Methode zur massanalytischen Bestimmung der Harnsäure im Harne. Von F. Czapek, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XII, S. 502.

nachdem wir heute wissen, dass durch die ammoniakalische Silberlösung ausser der Harnsäure auch die sogenannten Xanthinkörper gefällt werden. Hingegen hat sich die ursprünglich von Salkowski in Vorschlag gebrachte¹⁾ und später von E. Ludwig erfolgreich modificirte Methode²⁾, — welche im Wesentlichen auf der Isolirung der Harnsäure als Silbermagnesiumsalz, Zersetzung des Niederschlages mit Schwefelnatrium, Abfiltrirung der ausgeschiedenen Harnsäure durch Glaswolle, Trocknen und Wägen beruht — als eine exacte und verlässliche Methode bewährt. Wer jedoch Gelegenheit hatte, die Harnsäure im Harne nach der Salkowski-Ludwigschen Methode wiederholt zu bestimmen, wird sicherlich mit mir darin übereinstimmen, dass diese Methode für die Zwecke der Praxis zu umständlich und zeitraubend ist.

Einfacher in der Ausführung ist das Verfahren von Hopkins, nach welchem die Harnsäure aus dem gefällten Ammonurat durch Salzsäure in Freiheit gesetzt, und diese entweder gewogen oder ihre Menge durch Titiren mit Permanganat ermittelt wird. Von dieser Methode hat Hopkins³⁾ später eine Abkürzung vorgeschlagen, welche darin besteht, dass man den Ammonuratniederschlag mit Ammonsulfatlösung bis zur Chlorfreiheit auswäscht, hierauf den Niederschlag in heissem Wasser und einigen Tropfen Soda-lösung löst und auf 100 ccm. auffüllt. Nach Zusatz von 20 ccm. concentrirter Schwefelsäure wird auf 60° C. erwärmt und mit $\frac{1}{20}$ -Normalpermanganatlösung titrit, bis die Rosafärbung in einigen Secunden verschwindet. Jeder Cubikcentimeter dieser Lösung entspricht 3,75 mg Harnsäure. Dem Endresultate ist 1 mg Harnsäure für je 15 ccm. der gemessenen Mutter-lauge hinzuzufügen.

Diese titrimetrische Bestimmung der Harnsäure gibt nach den von mir durchgeführten Kontrollanalysen bei reinen Harnsäurelösungen sehr befriedigende Resultate. Anders gestalten

1) Leube und Salkowski, Die Lehre vom Harn, S. 96.

2) Wiener medicinische Jahrbücher, S. 97, 1884.

3) The Journal of Patholog and Bacteriolog, June 1893, S. 458.

sich die Verhältnisse bei Bestimmung der Harnsäure in Harnen, wo ich die Harnsäure durch Titration nach Hopkins und durch Wägen der Harnsäure nach Salkowski-Ludwig bestimmt habe. Ich erhielt in der Regel nach Hopkins etwas höhere Resultate; was aber besonders bei der Hopkin'schen Methode auffällt, ist die Thatsache, dass bei zahlreichen, namentlich pathologischen Harnproben das Ende der Reaction absolut nicht sicher zu erkennen war, und in solchen Fällen übersieht man selbst sehr leicht den Endpunkt und titirt über. Auch nach G. von Ritter¹⁾ erscheint die Titrirung des Ammonurats nach Hopkins unsicher und überdies gibt Ritter als Coefficienten zur Berechnung der Harnsäure aus der Permanganatlösung nicht 3,75, sondern 3,61 mg Harnsäure an. Eine beachtenswerthe Modification erfuhr die Hopkins'sche Methode von O. Folin.²⁾ Derselbe constatirte zunächst die Richtigkeit des von Hopkins vorgeschlagenen Coefficienten von 3,75 mg Harnsäure auf 1 ccm. $\frac{1}{20}$ -Normalpermanganatlösung und bestätigte auch die völlige Unlöslichkeit des Ammonurates in einer gesättigten Chlorammonlösung. Jedoch fand Folin, dass durch die Hopkin'sche Correctur ein Fehler eingeführt wird, da die Löslichkeit der Harnsäure in salzsäurehaltigem Wasser grösser ist; die Correctur beträgt nicht 1 mg Harnsäure auf 15 ccm. Mutterlauge, sondern 3 mg für Mutterlauge und Waschwasser. Die weiteren Versuche Folin's ergaben, dass die Harnsäure im Harne auch vollkommen durch Ammoncarbonat, Ammonsulfat oder Ammonacetat gefällt werden kann, wodurch der störende Einfluss der Chloride bei der Titration mit Permanganat ausser Betracht kommt und das Auswaschen des Niederschlages mit Ammonsulfat schneller erfolgt. Ich habe auch nach dieser Methode eine Reihe von quantitativen Harnsäurebestimmungen durchgeführt, und zwar sowohl mit reinen Harnsäurelösungen als auch mit der aus verschiedenen normalen und pathologischen Harnen abgetrennten Harnsäure und bin hierbei zu dem Ergebnisse

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 288.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 224—225.

gelangt, dass auch die Hopkins-Folin'sche Methode in vielen pathologischen Fällen im Vergleiche zu der Ludwig-Salkowski'schen Methode etwas zu hohe Resultate liefert. Die Ursache dieser Differenz ist darauf zurückzuführen, dass einerseits der Endpunkt der Titration in mannigfachen Fällen schwierig zu erkennen ist, sodass ein Mehrzusatz von $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ ccm. einer $\frac{1}{20}$ -Normalpermanganatlösung leicht erfolgen kann, andererseits ist es nicht ausgeschlossen, dass bei der Abscheidung der Harnsäure im Harne mit essigsauerm Ammon zuweilen auch geringe Mengen anderer Harnsubstanzen mitgefällt werden, welche mit Permanganat oxydirbar sind. Aus meinen zahlreichen vergleichenden Harnsäurebestimmungen, die ich nach dieser und der Ludwig-Salkowski'schen Methode ausgeführt und deren Ergebnisse ich an anderer Stelle dieser Arbeit angeführt habe, geht mit Sicherheit hervor, dass zwar die Hopkins-Folin'sche Methode bei reinen Harnsäurelösungen und bei verdünnten normalen Harnproben sehr befriedigende Resultate liefert, dass jedoch in vielen — namentlich pathologischen — Fällen die Resultate im Vergleiche zu der Ludwig-Salkowski'schen Methode zu hoch ausfallen, so dass diese Methode nicht in allen Fällen jene Verlässlichkeit bietet, die wir von einer exacten Methode verlangen müssen.

Wenn wir berücksichtigen, dass die Einwirkung der Permanganatlösung auf Harnsäure nach der Hopkins-Folin'schen Methode keineswegs einer einfachen Oxydationsgleichung zwischen diesen beiden Körpern entspricht, sondern dass dies Verhältniss nur auf empirischen Wege ermittelt wurde, so lag die Frage nahe, ob nicht durch Aenderung der Oxydationsbedingungen aus der Harnsäure Substanzen resultiren können, die den Process in chemischem Sinne besser verfolgen und die Methode auf einer verlässlicheren Basis aufbauen lassen können. Zur Entscheidung dieser Frage habe ich die Einwirkung von Oxydationsmitteln auf Harnsäure einem eingehenden Studium unterworfen, und es ist mir in der That gelungen, eine neue Methode ausfindig zu machen, welche die Bestimmung der Harnsäure im Harne in einfacher, exacter und verlässlicher Weise gestattet.

Bevor ich jedoch auf diese Methode des Näheren eingehe, gestatte ich mir zunächst die Ergebnisse meiner systematisch durchgeführten Oxydationsversuche bekannt zu geben, da dieselben geeignet erscheinen, einerseits eine Reihe von Angaben, die sich in der Litteratur vorfinden, richtig zu stellen, andererseits einen Beitrag zur Kenntniss der Harnsäure zu liefern.

Experimenteller Theil.

I. Quantitative Bestimmung der Harnsäure in reinen Harnsäurelösungen und in diversen Harnproben nach der Hopkins-Folin'schen Methode.

a) Versuche mit reiner Harnsäure.

Zu den nachfolgenden Versuchen benutzte ich eine Harnsäure, die durch Umkrystallisiren rein erhalten worden war. Die Harnsäure wurde durch Wasser abgeschieden, säurefrei gewaschen, dann mit Alkohol und Aether nachgewaschen und bei 120° C. getrocknet. Von der so erhaltenen Säure wurde nun eine Lösung von bekanntem Gehalte hergestellt, indem 4 g Harnsäure unter Zusatz von etwas chemisch reiner Natronlauge gelöst, und die Lösung mit destillirtem Wasser auf einen Liter aufgefüllt wurde.

Titer der verwendeten Permanganatlösung:

1 ccm. $\text{KMnO}_4 = 0,0027238 \text{ g Eisen} = 3,648 \text{ mg Harnsäure}$.
(Nach Folin ist 1 ccm. $\text{n}/_{20}\text{-KMnO}_4 = 0,0028 \text{ g Eisen} = 3,75 \text{ mg Harnsäure}$).

Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, dass abgemessene Mengen der alkalischen Harnsäurelösung mit 50 ccm. Wasser verdünnt, hierauf mit verdünnter Schwefelsäure neutralisirt, dann nach Zusatz von 15 ccm. concentrirter Schwefelsäure (spec. Gew. 1,84) mit der Permanganatlösung vorschriftsmässig solange titirt wurden, bis ein Tropfen der Permanganatlösung in der Lösung eine deutliche Rothfärbung hervorrief. Der Endpunkt der Reaction liess sich deutlich erkennen. Bei jedem Versuche wurden 2 Titrationen ausgeführt und aus den Resultaten das Mittel gezogen. Die Resultate waren folgende:

Laufende Nummer	Angewandt Harnsäure in mg	Gefunden Harnsäure in mg
1	50 mg	50,016 mg
2	50 „	50,122 „
3	50 „	50,016 „
4	75 „	75,048 „
5	75 „	75,060 „
6	75 „	75,126 „
7	100 „	100,028 „
8	100 „	100,101 „
9	100 „	100,247 „
10	100 „	100,035 „

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass Harnsäure in reinen Harnsäurelösungen durch Titration mit Permanganat vollkommen quantitativ bestimmt werden kann.

b) Versuche mit normalen und pathologischen Harnproben.

In der nachstehenden Tabelle sind eine Reihe von Harnsäurebestimmungen angeführt, die ich nach der Ludwig-Salkowski'schen Methode und nach der Folin'schen Methode in verschiedenen Harnproben ausgeführt habe. Die Bestimmung der Harnsäure nach Folin geschah wie folgt: 100 ccm. Harn wurden mit 10 g essigsaurem Ammon versetzt und dann Ammoniak tropfenweise unter Umrühren solange hinzugefügt, bis der Harn einen schwach ammoniakalischen Geruch zeigte. Nach 3stündigem Stehen wurde filtrirt, der Niederschlag mit einer gesättigten Lösung von kohlensaurem Ammon chlorfrei gewaschen, was in der Regel nach 6 bis 8maligem Waschen erreicht war, dann der Niederschlag mit etwa auf 80° C. erwärmtem destillirten Wasser vom Filter in ein Becherglas gespült, mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert, mit 15 ccm. concentrirter Schwefelsäure vom specifischen Gewicht 1,845 versetzt und mit einer ca. $\frac{1}{20}$ -Normalpermanganatlösung titirt.

Titer der Permanganatlösung:

1 ccm. = 0,0027239 g Eisen = 3,648 mg Harnsäure.

Es wurde nun in 20 Harnen die Harnsäure je zweimal nach dem beschriebenen Folin'schen Verfahren und ebenso wieder paarweise nach Ludwig-Salkowski bestimmt und in der nachstehenden Tabelle aus den Doppelbestimmungen das Mittel angeführt.

Es wurde pro Liter Harn Harnsäure in Gramm gefunden:

	Art der Harne	Harnsäure in Gramm nach Folin	Harnsäure in Gramm nach Ludwig- Salkowski	Differenz in Gramm	Differenz in Procenten
1	Normaler Harn	0,4458	0,4271	0,0187	4,19
2	Normaler Harn	0,4934	0,4732	0,0202	4,09
3	Normaler concentrirter Harn (Spec. Gew. 1,0285)	0,6059	0,5730	0,0329	5,43
4	Normaler concentrirter Harn (Spec. Gew. 1,029)	0,5392	0,5160	0,0232	4,30
5	Normaler Harn	0,5618	0,4840	0,0778	13,85
6	Normaler verdünnter Harn . (Spec. Gew. 1,016)	0,2783	0,2690	0,0093	3,34
7	Normaler verdünnter Harn . (Spec. Gew. 1,014)	0,2548	0,2472	0,0076	2,99
8	Normaler verdünnter Harn . (Spec. Gew. 1,0175)	0,3129	0,3059	0,0070	2,20
9	Normaler Harn	0,4378	0,4160	0,0218	4,98
10	Normaler concentrirter Harn (Spec. Gew. 1,032)	0,7413	0,6858	0,0555	7,49
11	Fieberharn	0,7551	0,6720	0,0831	11,00
12	Fieberharn	0,6129	0,5783	0,0346	5,63
13	Fieberharn	0,8632	0,7828	0,0804	9,19
14	Eiweiss-harn	0,6275	0,5439	0,0836	13,32
15	Diabetikerharn	0,4359	0,3968	0,0391	8,97
16	Diabetikerharn	0,4454	0,3722	0,0732	16,43
17	Icterischer Harn	0,3502	0,3181	0,0321	9,17
18	Harn eines Typhuskranken . (Diazo-Reaction positiv, Spuren von Albumin und Nucleoalbumin)	0,6129	0,5780	0,0349	5,69
19	Harn eines Nephritikers . .	0,4870	0,4695	0,0175	3,59
20	Harn nach einem Gichtanfälle	0,7134	0,6394	0,0740	10,37

Wie aus der Tabelle hervorgeht, kommen zwar in einzelnen Fällen die Resultate nach Folin den Ergebnissen nach Ludwig-Salkowski ziemlich nahe, in der Mehrzahl der Fälle jedoch fallen die Resultate nach Folin stets höher aus, als die nach Ludwig-Salkowski, und zwar ist die Differenz um so grösser, je concentrirter der Harn ist. Wenn wir berücksichtigen, dass der Verlust, welchen man bei der Ludwig-Salkowski'schen Methode hat, nach Ludwig's eigener Angabe nur 2% beträgt, so kann das relativ erhebliche Plus an Harnsäure, welches nach der Folin'schen Methode namentlich in concentrirten und pathologischen Harnen gegenüber der Ludwig-Salkowski'schen Methode resultirt, wohl nur darauf zurückgeführt werden, dass entweder der Folin'sche Harnsäuretiter für die aus den Harnen abgeschiedene Harnsäure etwas zu hoch ist, oder dass durch den Zusatz des essigsäuren Ammons auch geringe Mengen anderer organischer Substanzen mitfallen, die durch Permanganat ebenfalls oxydirt werden.

Nach Folin's Untersuchungen kommen bei der Harnsäurefällung von den Xanthinbasen weder Xanthin und Hypoxanthin, noch Guanin in Betracht. Nach meinen Versuchen, auf die ich an anderer Stelle noch zurückkommen werde, dürften die Xanthinbasen überhaupt nicht das Plus an Permanganat bedingen. Welche Harnsubstanzen den störenden Factor bei der titrimetrischen Harnsäurebestimmung im Harne nach Folin bilden, ist vorläufig nicht bekannt, jedenfalls aber steht die Thatsache fest, dass die Folin'sche Methode in Harnen in der Regel etwas zu hohe Resultate liefert.

Der Umstand nun, dass die aus dem Harne abgeschiedene Harnsäure nach erfolgter Oxydation mit Permanganat bis zur Rothfärbung noch weiter oxydationsfähig erscheint, indem die Rothfärbung in manchen Fällen nach einigen Minuten, häufig aber schon nach einer halben Minute verschwindet, welche Erscheinung beim Erwärmen sofort eintritt, hat mich veranlasst, die Oxydation in weitergehendem und stärkerem Maasse durchzuführen, zu dem Zwecke, um festzustellen, ob sich nicht das Endoxydationsprodukt für die quantitative Harnsäurebestimmung geeigneter erweisen würde.

Um nun bei diesen Versuchen nicht mit zu grossen Flüssigkeitsmengen arbeiten zu müssen, wurden die weiteren Oxydationsversuche nicht mit $n|20$ -Permanganatlösung, sondern mit einer Permanganatlösung, die im Liter 8 g KMnO_4 enthielt, also mit einer ca. $n|_4$ Permanganatlösung durchgeführt. Bei der jeweiligen Einwirkung von Permanganat auf Harnsäure resultirte in allen Fällen ein Körper, der mit Bromlauge relativ viel Stickstoff entwickelte. Um nun die Stickstoffentwicklung quantitativ zu verfolgen, wurden eine Reihe von Versuchen mit Hilfe des Harnstoffapparates von Hüfner durchgeführt. Der Vorgang bei den diesbezüglichen Versuchen war folgender:

I. Oxydationsversuche mit Permanganat.

Eine alkalische Harnsäurelösung von bekanntem Gehalte an Harnsäure wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit einem Ueberschuss an Permanganatlösung in der Kochhitze oxydirt. Die Oxydation wurde als beendet angesehen, sobald erst nach 10 bis 12 Minuten langem Kochen der letzte Permanganatzusatz verschwand, in welchem Falle die Flüssigkeit vollkommen klar, d. h. frei von unoxydirtter Harnsäure erscheint. Zu den Versuchen diente eine vollkommen chemisch reine Harnsäure, deren N-Gehalt 33,33% N betrug.

Versuch 1. 50 ccm. einer alkalischen Harnsäurelösung enthielten 0,1494 g Harnsäure. Die verwendete Harnsäure, bezogen von einer hiesigen chemischen Fabrik, enthielt 33,33% N (Mittel von 3 Analysen). Diese Lösung wurde in oben angegebener Weise oxydirt, dann auf 100 ccm aufgefüllt und die N-Bestimmung im Hüfner'schen Apparate durchgeführt. Der von mir benutzte Hüfner'sche Apparat fasste genau 7,218 ccm; demzufolge entsprechen 7,218 ccm. des Oxydationsproduktes 0,010789 g Harnsäure = 0,003577 g N; gefunden wurden 3,0 ccm N bei 735 mm Barometerstand und 13° C.

Das N-Volumen — auf 0° und 760 mm Barometerstand reducirt — beträgt 2,82 ccm. N, entsprechend 3,4419 mg Stickstoff.

Vorausgesetzt, dass bei der in der beschriebenen Weise durchgeführten Oxydation der Harnsäure kein N-Verlust statt-

findet, entsprechen 7,218 ccm. der Oxydationsflüssigkeit 0,01078 g ursprünglicher Harnsäure. Nun sind volumetrisch 3,52793 mg N. oder auf N in der Harnsäure umgerechnet 32,73% N, statt 33,33% gefunden worden.

Versuch 2. Derselbe Versuch wiederholt ergab 3,1 ccm. N oder auf N in der Harnsäure umgerechnet 33,72% N.

Aus diesen Versuchen darf wohl der Schluss gezogen werden, dass thatsächlich der gesammte N der verwendeten Harnsäure wiedergefunden wird, denn das geringe Plus oder Minus an N, welches aus den bei den beiden Versuchen erhaltenen Zahlen ersichtlich ist, lässt sich wohl nur darauf zurückführen, dass erstens bei einem so kleinen Volumen ein geringer Fehler in der Ablesung einen — in Procenten ausgedrückt — relativ erhöhten Fehler bedingt, und dass zweitens nach Einwirkung von Bromlauge auf das saure Oxydationsprodukt ein flockiger Niederschlag von Manganoxydulhydrat ausfällt, der in das Endiometerrohr theilweise aufsteigt und die absolut correcte Ablesung verhindert.

Ueber den Verlauf der Reaction bei Einwirkung von Permanganat auf Harnsäure.

Bevor ich an die Ausarbeitung des Oxydationsverfahrens zur quantitativen volumetrischen Bestimmung der Harnsäure herangetreten bin, habe ich zunächst versucht, den Verlauf des Oxydationsprocesses festzustellen.

Zur Entscheidung der Frage, ob bei der Oxydation der Harnsäure mit Permanganat irgend welche N-Verbindungen entweichen, habe ich zunächst reine Harnsäurelösungen von bestimmtem N-Gehalte in der beschriebenen Weise mit Permanganat oxydirt und den N im Oxydationsprodukte bestimmt. Ich erlaube mir einen solchen Versuch anzuführen:

0,5076 g Harnsäure wurden mit Wasser aufgeschlämmt, mit 10 ccm. concentrirter Schwefelsäure versetzt, hierauf mit concentrirter Permanganatlösung unter Erwärmen so lange oxydirt, bis der letzte Permanganatzusatz nach ca. 10 Minuten langem Kochen verschwunden ist.

Hierauf wurde die Flüssigkeit etwas eingeeengt, mit 1

Tropfen Quecksilber und 10 ccm. concentrirter Schwefelsäure versetzt und nach ca. zweistündigem Kochen der N-Gehalt nach Kjeldahl in bekannter Weise bestimmt.

In der oxydirten Harnsäure gefunden 33,22% N. Der N-Gehalt der reinen Harnsäure beträgt 33,33% N.

Hieraus geht also hervor, dass bei der Oxydation der Harnsäure mit Permanganat in saurer Lösung ein N-Verlust nicht erfolgt. In der Annahme, dass bei dem in Rede stehenden Oxydationsprocesse sich möglicher Weise schwefelsaures Ammon bilden könne, zumal in der Litteratur sich Angaben finden, welche diese Ansicht hervorrufen könnten, habe ich versucht, in dem Endoxydationsprodukte etwa vorhandenes schwefelsaures Ammon durch Destillation mit Lauge quantitativ zu bestimmen. Die durchgeführten Versuche ergaben zwar, dass bei der Destillation des Endoxydationsproduktes der Harnsäure mit Lauge sich thatsächlich etwas Ammoniak entwickelt, jedoch lange nicht in der Menge, als dem N-Gehalte der Harnsäure entsprechen würde. Ich lasse nachfolgend die Ergebnisse eines derartigen Versuches folgen.

50 ccm. von einem Harnsäure-Oxydationsprodukt, entsprechend 0,3314 g Harnsäure, wurden mit 50 ccm Lauge versetzt, destillirt, und das Destillat in titrirter Schwefelsäure aufgefangen. Die vorgelegten Cubikcentimeter Schwefelsäure entsprachen

9,31 ccm. Lauge und

1 ccm Lauge = 0,025708 g KOH.

Zurücktitrirt wurden: 7,02 ccm. Kalilauge.

Bei einem zweiten Versuche 7,23 » »

» » dritten » 7,81 » »

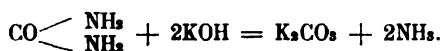
» » vierten » 7,48 » »

Im Mittel: 7,37 ccm. Kalilauge. Somit wurden 9,31 weniger 7,37 = 1,94 ccm. Kalilauge, resp. die dieser Menge entsprechende Säuremenge zur Bindung des Ammoniaks verbraucht. Nun entsprechen: 1,94 ccm. Kalilauge = 0,04987 g KOH = 0,01247 g N; diese Stickstoffmenge ist aber nur 3,74% der Harnsäure = ca. 11% des Stickstoffs. Nachdem in der Harnsäure 33,33% N enthalten ist, so ist thatsächlich nur ein sehr

kleiner Theil der Harnsäure, ca. $\frac{1}{9}$, des Stickstoffs, in Ammoniak übergeführt worden.

Erwähnenswerth erscheint hierbei die Thatsache, dass man bei Einhaltung gleicher Bedingungen in Bezug auf Kochdauer und Zusatz von Lauge resp. Concentration der Lösung für ein und dieselbe Menge des Endoxydationsproduktes der Harnsäure nahezu die gleichen N-Mengen im Destillate findet.

Die obigen Destillationsversuche wurden natürlich — da es sich für mich um die Bestimmung des Ammoniaks in dem vorhandenen schwefelsauren Ammoniak handelte — genau in der Weise durchgeführt, wie es bei der Kjeldahl'schen Methode üblich ist. Wurde jedoch der Rückstand neuerdings mit destillirtem Wasser verdünnt und gekocht, so entwickelte sich wiederum Ammoniak. Sobald der Inhalt des Kolbens eine für weiteres Kochen zu hohe Concentration erreicht hat, wurde abermals mit Wasser verdünnt und gekocht, wobei wiederum Ammoniak-Entwicklung auftrat. Diese Manipulation wurde nun so oft wiederholt, bis keine Spur von Ammoniak mehr wahrgenommen werden konnte, was für die in Verwendung genommene Harnsäuremenge resp. deren entsprechendes Oxydationsprodukt nach ca. 13 bis 14 stündigem Kochen eingetreten ist. Alsdann konnte in dem Rückstande keine Spur von N mehr nachgewiesen werden. Die langsame und ziemlich gleichmässige Abspaltung von Ammoniak bei den Destillationen lässt darauf schliessen, dass das Ammoniak eben erst während der Destillation durch die Einwirkung der Lauge auf den Harnstoff entsteht.



Aus den angeführten Versuchen geht zunächst die Thatsache hervor, dass bei der Oxydation der Harnsäure in saurer Lösung mit Permanganat von einer quantitativen Bildung von schwefelsaurem Ammon nicht die Rede sein könne, nachdem bei der üblichen Destillation nur 11,3% N des Harnsäure-N gefunden wurden. Des Weiteren zeigen die Versuche, dass der N des Endoxydationsproduktes der Harnsäure quantitativ in Ammoniak — bei Einhaltung bestimmter Bedingungen —

übergeführt werden kann. Letztere Methode hat aber nur ein theoretisches Interesse, nachdem die zur vollständigen Ueberführung in Ammoniak erforderliche Zeit eine relativ sehr grosse ist, ganz abgesehen von der sonstigen Umständlichkeit des Verfahrens.

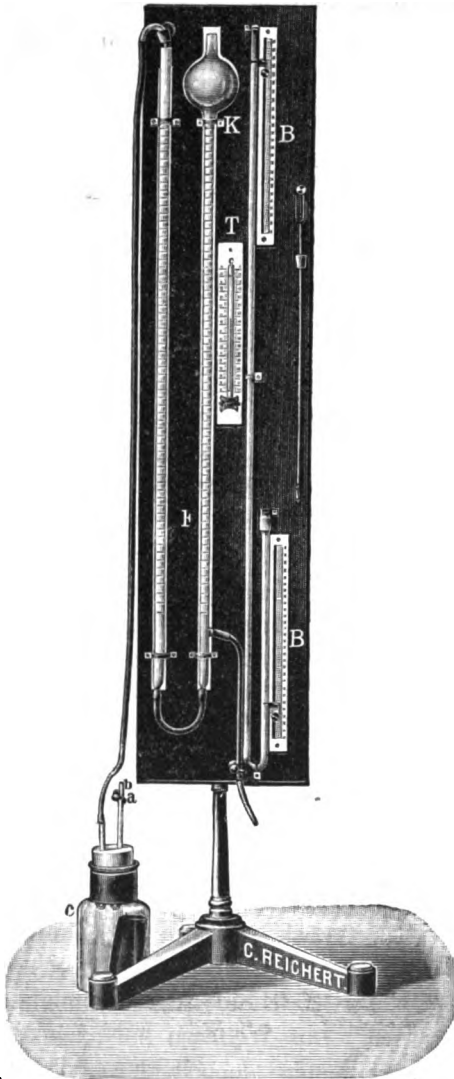
Die Thatsache, dass bei der Oxydation der Harnsäure in saurer Lösung mit Permanganat kein schwefelsaures Ammon entsteht, wurde auch dadurch erwiesen, dass zu dem unter Kühlung alkalisch gemachten und filtrirten Oxydationsprodukte Nessler'sches Reagens hinzugefügt wurde. Hierbei entstand keine für Ammoniak charakteristische Färbung resp. Niederschlag, sondern es konnte nur das Auftreten eines hellgelben Niederschlages beobachtet werden, wie solcher nach Zusatz von Nessler'schem Reagens zu einer Harnstofflösung entsteht. Letztere Beobachtung steht zwar im Widerspruche mit den in der Litteratur gemachten Angaben, dass Harnstoff in saurer Lösung durch Permanganat unter Bildung von Kohlensäure, Ammoniak und Stickstoff¹⁾ zersetzt wird; einschlägige Versuche ergaben jedoch die Unrichtigkeit dieser Angaben, indem eine mit Schwefelsäure angesäuerte Harnstofflösung selbst beim Kochen durch Permanganat nicht oxydirt wird. Wurde ein Theil des Oxydationsproduktes der Harnsäure mit zwei bis drei Tropfen Furfurol und etwas Salzsäure versetzt, so trat nach 5 bis 10 Minuten eine deutliche Violettfärbung auf, welche Reaction bei einer mit Schwefelsäure angesäuerten Harnstofflösung in gleicher Weise verläuft. Des Weiteren wurde zur Feststellung der Identität des Endoxydationsproduktes ein Theil desselben mit salzsaurem Phenylhydrazin versetzt, zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und auskrystallisiren gelassen. Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch mit einer Harnstofflösung von entsprechendem Gehalt an Harnstoff, schwefelsaurem Mangan und freier Schwefelsäure durchgeführt, indem diese Lösung nach Zusatz von Phenylhydrazin ebenfalls 2 Stunden am Wasserbade gekocht und erkalten gelassen wurde. Die ausgeschiedenen Krystalle zeigten in beiden Fällen die gleiche

¹⁾ Béchamp, Jahresber. f. Ch. 1856. 696.

Krystallform wie Phenylsemicarbazid und ergaben einen Schmelzpunkt, der zwischen 172—173° C. lag. Nunmehr wurde ein anderer Theil des Endoxydationsproduktes mit dem gleichen Volumen 96%igen Alkohols versetzt, nach zweistündigem Stehen von der Hauptmenge des abgeschiedenen schwefelsauren Manganoxyduls abfiltrirt, die freie Schwefelsäure, sowie der Rest der vorhandenen Sulfate mit Chlorbaryum gefällt, abfiltrirt, das Filtrat auf ein kleines Volumen eingedampft, mit etwas concentrirter Salpetersäure versetzt, einige Minuten erwärmt und dann stehen gelassen. Nach mehrstündigem Stehen fielen Krystalle aus, die sich als identisch mit denen des salpetersauren Harnstoffes erwiesen.

Aus den obigen Versuchsergebnissen geht zweifellos hervor, dass das Endoxydationsprodukt aus Harnstoff besteht, und ich war nunmehr bemüht, den quantitativen Verlauf des Processes festzustellen. Zu diesem Zwecke wurden genau abgewogene Harnsäuremengen in der bereits beschriebenen Weise oxydirt, nach beendeter Oxydation concentrirte Lauge portionsweise hinzugefügt, wobei man nach jedesmaligem Zusatze der Lauge das Gefäss behufs Abkühlung in ein Becherglas mit kaltem Wasser stellt. Zum Schlusse setzt man einen geringen Ueberschuss an Lauge hinzu, was mit Lackmuspapier leicht zu constatiren ist. In dem alkalischen Oxydationsprodukte wurde nun der Harnstoff mit Bromlauge volumetrisch bestimmt. Da der Hüfner'sche Apparat aus den bereits angegebenen Gründen sich für die N-Bestimmungen im vorliegenden Falle nicht eignete, habe ich zu diesen Versuchen den Knop'schen Azotometer herangezogen. Einige Vorversuche mit diesem Apparate machten jedoch die Verwendung eines in mehreren Punkten modificirten Apparates nothwendig (Fig. 1). Zunächst musste ein Schüttelgefäss von bedeutend grösserem Volumen (ca. 330 ccm.), ebenso ein grösseres Gefäss zur Aufnahme der Bromlauge (ca. 50 ccm.) verwendet werden. Des Weiteren habe ich auf dem Hals des Schüttelgefässes einen doppelt durchbohrten Stopfen derart anbringen lassen, dass der Stopfen nur etwa zur Hälfte in den Hals hineinragt; durch jede der beiden seitlich angebrachten Bohrungen geht ein Glasrohr, dessen

Enden entsprechend aufgebogen sind. Diese Einrichtung bezweckt, dass beim Schütteln keine Flüssigkeit in die Glas-



röhren resp. in den Verbindungsschlauch gelangt. Das obere Ende des einen Rohres ist mit einem kurzen Schlauch und gut schliessendem Quetschhahn versehen, um den beim Schliessen des Stopfens entstehenden Ueberdruck ausgleichen zu können; das andere Rohr ist mittelst eines dichten Schlauches mit dem einen Massrohr verbunden. Die beiden Massröhren sind an einem Wandgestell derart angebracht, dass sie behufs eventueller Reinigung herausgenommen, doch jederzeit in die ursprüngliche Lage genau zurückgebracht werden können. Zur genauen Ablesung sind beide Röhren in $\frac{5}{100}$ ccm. getheilt, derart, dass je 2 entsprechende Theilstriche in einer Horizontalinie liegen, überdies ist der Hintergrund der Röhren matt geätzt.

Ferner ist an dem Apparate ein Thermometer, sowie ein Aneroid-Barometer für Ablesungen zwischen 730—760 mm. angebracht. Im Uebrigen ist die Arbeitsweise mit diesem

Apparate¹⁾ die gleiche, wie mit dem Knop-Wagner'schen Azotometer.

Quantitative Bestimmungen mit reiner Harnsäure.

Zu den vorliegenden Versuchen diente eine vollkommen chemisch reine Harnsäure, deren N-Gehalt 33,33 % betrug.

Versuch I. 4,2978 g Harnsäure wurden in Wasser aufgeschlämmt, mit 60 ccm. Schwefelsäure (Dichte 1,4) angesäuert, hierauf mit einer concentrirten Permanganatlösung (6 g KMnO_4 pro Liter) oxydirt und zwar derart, dass jedesmal ca. 5 ccm. KMnO_4 -Lösung hinzugefügt wurden, bis der letzte Permanganat-Zusatz innerhalb $\frac{1}{4}$ stündigen Kochens nicht mehr verschwand. Alsdann ist die Oxydation als beendet anzusehen und man lässt hierauf einige Tropfen einer verdünnten Oxalsäurelösung (ca. n/10) unter Umrühren so lange zufließen, bis die Lösung entfärbt ist oder eventuell einen schwachen röthlichen Stich noch zeigt. Das Oxydationsprodukt wurde hierauf in einen Literkolben gespült, dann portionsweise concentrirte N-freie Lauge hinzugefügt, nach jedesmaligem Zusatze von etwas Lauge gekühlt, zum Schlusse alkalisch gemacht und hierauf mit destillirtem Wasser bis zur Marke aufgefüllt und gut durchgeschüttelt. Von dieser Lösung wurden verschiedene Quantitäten zur N-Bestimmung entnommen und überdies zur Kontrolle zweimal in je 100 ccm. der Harnstoff quantitativ als oxalsaurer Harnstoff nach der von Professor Gottlieb (Ueber die qualitative Bestimmung des Harnstoffes in den Geweben etc., Archiv f. exp. Path. und Pharmakolog. XLII, 238) und später von Freund und Töpfer (Ueber eine neue Methode der Harnstoffbestimmung im Harne, Wiener klinische Rundschau, S. 371. 1899) vorgeschlagenen Methode bestimmt.

Zu den N-Bestimmungen wurden entnommen:

a)	20 ccm. der Lösung;	dieselben lieferten 25,2 ccm. N bei 20° T. u. 754 mm. B
b)	25 „ „ „ „ „	31,5 „ „ 20° „ 754 „
c)	40 „ „ „ „ „	50,8 „ „ 20° „ 754 „
d)	20 „ „ „ „ „	25,3 „ „ 20° „ 754 „
e)	20 „ „ „ „ „	25,2 „ „ 20° „ 754 „

¹⁾ Der Apparat wird von dem optisch-mechanischen Institute von Carl Reichert in Wien hergestellt.

Aus obigen Bestimmungen berechnet sich für 20 ccm. des Oxydationsproduktes im Mittel 25,2 ccm. bei 20° T. und 754 mm. B. Auf 0° und 760 mm. B. reducirt, resultiren

22,78 ccm. N = 28,49994 mg N.

(1 ccm. N bei 0° und 760 mm. B. = 1,25104 mg N.)

Nun enthalten 20 ccm. des Oxydationsproduktes 0,085956 g Harnsäure, somit sind in 0,085956 g Harnsäure gefunden worden: 0,02849994 g N, also in 100 g Harnsäure = 33,15 g N.

Thatsächlich vorhanden sind 33,33% N; somit beträgt die Differenz 0,18%, d. h. es wird thatsächlich nach dem beschriebenen Oxydationsverfahren der gesammte N wiedergefunden, da die minimale Differenz nur auf geringe Ablesungsfehler zurückzuführen ist. Zu den Harnstoffbestimmungen wurden zweimal je 100 ccm. des alkalisch gemachten Oxydationsproduktes entnommen und die quantitative Ueberführung des Harnstoffes in oxalsäuren Harnstoff im Wesentlichen wie folgt durchgeführt:

100 ccm. wurden mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuert, eingengt, mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols versetzt, nach ca. 12 Stunden die abgeschiedenen Salze filtrirt, mit Alkohol harnstofffrei gewaschen (Prüfung mit Furfurol und HCl), der Alkohol auf dem Wasserbade abgedunstet und der Rückstand mit einer gesättigten ätherischen Oxalsäurelösung versetzt. Nach 12stündigem Stehen wurde filtrirt, mit Aether oxalsäurefrei gewaschen und in dem Rückstande von oxalsaurem Harnstoff der N nach Kjeldahl bestimmt.

Gefunden 0,01434 g N,
angewendet 0,4298 g Harnsäure,
gefundener N in Procenten 33,35%,
berechneter N „ „ 33,33%.

Versuch II. 3,2460 g Harnsäure wurden in gleicher Weise oxydirt und das Oxydationsprodukt auf 500 ccm. aufgefüllt. Es ergaben:

13,4 ccm. der Lösung	25 ccm. N bei 18,5° C. und 744 mm. B.
20,1 „ „ „	37,8 „ „ „ 18,5° „ „ 744 „
6,7 „ „ „	12,62 „ „ „ 18,5° „ „ 744 „
13,4 „ „ „	25,21 „ „ „ 18,5° „ „ 744 „
13,4 „ „ „	25,19 „ „ „ 18,5° „ „ 744 „

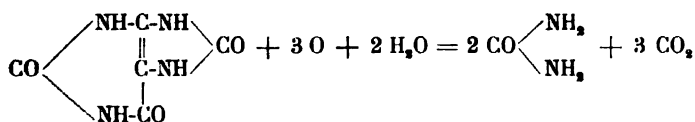
Im Mittel lieferten:

13,4 ccm. der Lösung 25,208 ccm. N bei 18,5° C. und 744 mm. B., oder auf 0° und 760 mm. B. reducirt 23,144 ccm. N = 28,9541 mg N. Nun enthalten 13,4 ccm. der Lösung 0,086992 g Harnsäure; es ergeben somit 0,086992 g Harnsäure 0,0289541 mg N, d. i. 33,28 % statt 33,33 %.

Nach diesen Versuchen ist es zweifellos, dass die Harnsäure bei der Oxydation mit Permanganat in der von mir angegebenen Weise quantitativ in Harnstoff übergeführt wird, sofern die Säureconcentration einen gewissen Grad nicht übersteigt und dieser auf volumetrischem Wege genau bestimmt werden kann.

Der hierbei stattfindende Oxydationsprocess besteht in einer gleichzeitigen Einlagerung von Wasser und einer oxydativen Zerstörung des Complexes der 3 mittleren Kohlenstoffatome. Versucht man, sich den Verlauf nacheinander vorzustellen, so muss man zuerst die Bildung von Harnstoff und dem hypothetischen Mesoxalhalbaldehyd $\text{CO} = \text{C}(\text{OH}) - \text{COOH}$ annehmen, welch letzterer dann sogleich zu Kohlensäure weiter oxydirt wird.

Das Endergebniss der Oxydation lässt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:



Bei der Einfachheit und Exactheit der Methode war es nun naheliegend, die Brauchbarkeit derselben für die Bestimmung der Harnsäure im Harne einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

Vorerst wurden eine Reihe von Versuchen angestellt, um festzustellen, welches Verfahren am geeignetsten sei, die Harnsäure aus dem Harne möglichst rein, also auch frei von Xanthinbasen, abzuscheiden. Meine Versuche erstreckten sich auf die Abscheidung der Harnsäure mittelst Chlorammons und schwefelsauren Ammons in verschiedenen Harnproben, die Resultate waren jedoch nicht gleichmässig befriedigende. Hin-

gegen hat sich das von Folin in Vorschlag gebrachte essigsaure Ammon in jeder Hinsicht bewährt, da einerseits die in Harnen hauptsächlich in Betracht kommenden Xanthinbasen nicht gefällt, andererseits Eiweiss und Zucker die Fällung der Harnsäure gar nicht beeinflussen. Ueberdies ist nach dem Versetzen des Harnes mit essigsaurem Ammon die Harnsäure in der Regel nach $2\frac{1}{2}$ stündigem Stehen vollkommen abgeschieden.

Ich gestatte mir nunmehr auf Grund zahlreicher vergleichender Versuche die volumetrische Bestimmung der Harnsäure in folgender Ausführung zu empfehlen.

Es werden — je nach der Concentration des Harnes — 50—200 ccm. Harn zur Bestimmung der Harnsäure verwendet. Die Methode gestattet, auch schon in 50 ccm. Harn den Gehalt an Harnsäure genau quantitativ festzustellen, jedoch empfiehlt es sich, bei stark verdünnten Harnen 100—200 ccm. Harn für die Bestimmung zu verwenden. Der Harn soll klar sein, daher müssen Urate durch Erwärmen in Lösung gebracht, etwaige sonstige suspendirte Bestandtheile durch Filtration entfernt werden. Je nach der verwendeten Harnmenge setzt man 5—20 g festes, essigsaures Ammon hinzu, rührt mit einem Glasstabe bei Zimmertemperatur so lange um, bis sich das essigsaure Ammon gelöst hat, was in der Regel in wenigen Minuten erfolgt. Hierauf fügt man zu dem Harne vorsichtig einige Tropfen Ammoniak hinzu, bis die Flüssigkeit einen schwachen Ammoniakgeruch zeigt. Ein grösserer Ammoniakzusatz hat zwar auf die Fällung der Harnsäure keinen Einfluss, es empfiehlt sich aber ein Mehrzusatz an Ammoniak aus dem Grunde nicht, weil die ausgefällten Phosphate die Schnelligkeit der Filtration beeinträchtigen und das nachherige Auswaschen des Niederschlages umständlicher von Statten geht.

Nunmehr lässt man den Inhalt des Becherglases $2\frac{1}{2}$ bis 3 Stunden stehen, während welcher Zeit mit dem Glasrohr öfters umgerührt wird. Hierauf wird filtrirt, am besten durch ein Schleicher'sches Filter, und der Niederschlag mit einer gesättigten Lösung von kohlensaurem Ammon ausgewaschen. Vorerst muss aber auch das Becherglas mit kohlensaurem

Ammon wiederholt ausgespült und diese Flüssigkeit durch das Filter gegossen werden, damit der gesammte Harnsäureniederschlag quantitativ auf das Filter gebracht werde. Um nun die letzten Spuren des Harnsäureniederschlages aus dem Becherglase zu entfernen, benützt man mit Vortheil einen Glasstab mit Gummikappe, mit dessen Hilfe die Wände des Becherglases mit der kohlensauren Ammonlösung abgespült werden. Sobald der gesammte Niederschlag sich auf dem Filter befindet, wird derselbe mit kohlensaurem Ammon so lange ausgewaschen, bis eine mit Salpetersäure angesäuerte Probe des Filtrates auf Zusatz von Silbernitratlösung keine Chlorreaction zeigt, was in der Regel nach 6—8maligem Auswaschen erreicht ist. Hierauf breitet man das Filter auf ein entsprechend grosses Uhrglas aus, spritzt den Niederschlag mit warmem Wasser quantitativ in ein Becherglas, fügt alsdann behufs Entfernung des überschüssigen kohlensauren Ammons und des an der Harnsäure gebundenen Ammons ca. $\frac{1}{10}$ g (bei Verwendung von 200 ccm. Harn etwa $\frac{2}{10}$ g) chemisch reine (also N-freie) Magnesia hinzu, erhält das Ganze unter wiederholtem Umrühren etwa eine halbe bis dreiviertel Stunden im Kochen und überzeugt sich von der Abwesenheit des Ammoniaks, indem man etwas befeuchtetes rothes Lackmuspapier den Dämpfen aussetzt. Tritt keine Spur einer Blaufärbung ein, dann ist sämmtliches Ammoniak entwichen. Nunmehr wird der Inhalt des Becherglases, welcher circa 3—400 ccm. beträgt, mit 10 ccm. reiner Schwefelsäure (1,4 Dichte) angesäuert und nach erfolgter Lösung des Magnesiumoxyds cubikcentimeterweise Permanganatlösung (etwa 8 g KMnO_4 pro Liter) unter andauerndem Erwärmen zugesetzt. Bei dieser Operation wird das Becherglas mit einem passenden Uhrglas bedeckt, um bei der eintretenden Kohlensäureentwicklung Verluste durch Spritzen zu vermeiden; der allmähliche Zusatz der Permanganatlösung während des Kochens erfolgt daher am besten so, dass man mittelst einer Pipette die Permanganatlösung längs der Wand des Becherglases hinzufliessen lässt. Die ersten Cubikcentimeter Permanganat verschwinden in der Regel schnell, später tritt die Entfärbung langsamer ein; als beendet

ist die Reaction anzusehen, wenn nach $\frac{1}{4}$ stündigem anhaltenden Erwärmen resp. mässigem Kochen der letzte Permanganatzusatz nicht mehr verschwindet. Bei Verwendung von 100 ccm. Harn genügen nach den bisherigen Versuchen in der Regel 5—10 ccm. der Permanganatlösung von oben angegebener Concentration. Der nach circa $\frac{1}{4}$ stündigem Kochen verbleibende Permanganatrest wird vortheilhaft durch tropfenweisen Zusatz von Oxalsäurelösung entfernt. Nunmehr lässt man das Becherglas durch Einstellen in kaltes Wasser erkalten, bringt in das Gefäss etwas Lackmuspapier und fügt hierauf concentrirte Lauge cubikcentimeterweise unter weiterem Kühlen und Umrühren so lange vorsichtig hinzu, bis das Lackmuspapier alkalische Reaction anzeigt. Hierauf wird der Inhalt des Becherglases quantitativ in das Schüttelgefäss C des Azotometers gespült, dann gibt man in das kleine Hartgummigefäss 20—25 ccm. Bromlauge¹⁾, und bringt dieses Gefäss am besten mittelst einer Pincette so vorsichtig in das Schüttelgefäss hinein, dass keine Vermengung der beiden Flüssigkeiten statt hat. Nunmehr füllt man die Maassröhren mit Wasser, setzt den Gummistopfen, der durch einen Vacuumschlauch mit dem einen Maassrohr verbunden ist, so auf das Schüttelgefäss, dass die Lage des Stopfens sich bei dem später zu erfolgenden Schütteln des Gefässes nicht ändern kann, da dies einen Fehler in der Bestimmung nach sich ziehen würde. Sobald beide Flüssigkeitssäulen in den Röhren dasselbe Niveau zeigen, wird das freie Schlauchende *b* am Gummistopfen durch einen passenden Quetschhahn *a* vorsichtig geschlossen und hierauf der Wasserstand im Maassrohr genau abgelesen. Hierauf wird das Schüttelgefäss so geneigt, dass beide Flüssigkeiten sich mischen, wobei sofort eine lebhafte Gasentwicklung eintritt. Man lässt alsdann in dem Maasse, als die Flüssigkeit in dem einen Rohre steigt, durch das unten mit Quetschhahn versehene Ausflussrohr Wasser so abfliessen, dass das Wasser in diesem Rohre um 1 bis 2 ccm. höher steht, als in dem anderen

¹⁾ 80 g Natronhydrat und 25 g Brom pro Liter.

Rohre.¹⁾ Sobald die starke Gasentwicklung etwas nachgelassen hat, schüttelt man das Gefäß durch einige Minuten mit der Vorsicht, dass die beiden aufgebogenen Glasenden entgegengesetzt dem Flüssigkeitsspiegel sich befinden, wobei man zweckmässig das Gefäß, um jede Erwärmung von aussen zu vermeiden, an dem um den Hals des Gefässes angebrachten Gummiringe festhält. Sobald keine Gasentwicklung mehr wahrnehmbar ist, was in der Regel nach ca. 5 Minuten der Fall ist, überlässt man das Schüttelgefäß durch ca. 10 Minuten der Ruhe, nach welcher Zeit der Temperatúrausgleich erfolgt.²⁾ Nunmehr stellt man das Wasser in den Röhren auf gleiches Niveau ein und liest den Wasserstand ab.³⁾ Die Differenz zwischen den vor dem Beginn und nach dem Abschlusse des Versuches constatirten Ablesungen ergibt die Anzahl der entwickelten Cubikcentimeter Stickstoffgas. Man liest hierauf Temperatur und Barometerstand ab und entnimmt aus der — der Bequemlichkeit wegen an dem Apparate angebrachten — Tabelle das Gewicht eines Cubikcentimeters N bei der abgelesenen Temperatur und Barometerstand. Dieses Gewicht, mit der Anzahl der entwickelten N multiplicirt, ergibt die Milligramme Stickstoff, diese mit 3 multiplicirt (100 Theile Harnsäure enthalten 33,33 Theile N) ergibt die Milligramme Harnsäure in der zur Untersuchung entnommenen Harnmenge, woraus sich der Harnsäuregehalt pro Liter Harn einfach berechnen, resp. aus einer Tabelle direkt entnehmen lässt.

Beispiel: Aus 100 ccm. Harn wurde die Harnsäure abgeschieden, der Niederschlag in der angegebenen Weise oxydirt, und der Stickstoff im Oxydationsprodukte volumetrisch bestimmt.

N-Volumen 13,6 ccm. bei 18° C u. 747 mm. B.

1 ccm. N bei 18° C und 747 mm. B = 1,138 mg N.

1) Stellt man nach beendeter Gasentwicklung beide Flüssigkeiten auf gleiches Niveau ein, so bildet sich nach erfolgter Abkühlung im Schüttelgefässe ein etwas luftverdünnter Raum, wodurch ein Niveauunterschied in beiden Röhren eintritt.

2) Versuche haben ergeben, dass selbst nach $\frac{1}{2}$ stündigem weiteren Stehen die Differenz höchstens $\frac{1}{10}$ ccm. in der Ablesung beträgt, so dass ein 10 Minuten langes Stehen vollkommen genügt.

3) Nach beendigter Ablesung wird der Gummistopfen, ebenso das Schüttelgefäß, sorgfältig gereinigt.

Demnach sind 13,6 ccm. N = 15,4768 mg N, oder auf Harnsäure berechnet,

$15,4768 \times 3 = 46,4304$ mg Harnsäure in 100 ccm. Harn.
Pro Liter Harn resultiren 0,4643 g Harnsäure.

Ich habe eine grosse Zahl von vergleichenden Harnsäure-Bestimmungen in diversen normalen und pathologischen Harnproben durchgeführt, und zwar nach der neuen volumetrischen Methode und nach den Methoden von Ludwig-Salkowski und Folin. Bei jeder Harnprobe wurde die Harnsäure je 2 mal nach der volumetrischen Methode und ebenso wieder paarweise nach Ludwig-Salkowski und Hopkins-Folin bestimmt und aus den Doppelbestimmungen das Mittel berechnet.

Die S. 245 wiedergegebene Tabelle enthält eine Reihe von Beleg-Analysen.

Um die Exactheit der volumetrischen Methode auch noch auf anderem Wege zu erweisen, wurden verschiedene Harnproben mit Natronlauge versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltrirt und in einer abgemessenen Menge des Filtrates die Harnsäure volumetrisch bestimmt. Hierauf wurde zu einer anderen abgemessenen Portion des alkalischen Harnes eine genau gewogene Menge einer absolut chemisch reinen Harnsäure hinzugefügt, die Harnsäure durch Umrühren in Lösung gebracht, alsdann wiederum mit essigsauerm Ammon abgeschieden, oxydirt und der N volumetrisch bestimmt.

Versuch I. Die volumetrische Bestimmung der Harnsäure in 100 ccm. eines alkalisch gemachten Harnes ergab:

13,3 ccm. N bei 20° C. und 744 B.

Zu 150 ccm. dieses alkalisch gemachten Harnes wurden hinzugefügt 0,1666 g Harnsäure.

In der aus diesen 150 ccm. Harn abgeschiedenen Harnsäure wurden gefunden:

61,8 ccm. N bei 20° C. und 744 mm. B.

1 ccm. N = 1,118 mg N.

Auf die zugesetzte Harnsäuremenge entfallen 61,8—13,3 = 48,5 ccm. N entsprechend 54,2230 mg N oder auf Harnsäure berechnet 0,162669 g Harnsäure. Im Filtrate des mit

Laufende Nummer	Harnsäure in g pro Liter nach Ludwig-Salkowski	Harnsäure in g pro Liter nach Hopkins-Folin	Volumetrische Methode					Bemerkungen
			Verwendete Harmmenge	N-Volumen in ccm.	Abgelesene Temperatur und Barometer- stand	Harnsäure in g volumetrische Methode	Differenz der volumetrischen Bestimmung gegenüber Ludwig	
1	0,4732	0,4934	100 ccm.	13,6	18° C., 747 B.	0,4643	— 1,9%	
2	0,5748	0,7187	100 >	18,05	25 1/2° > 740 >	0,5883	+ 2,3 >	
3	0,3680	0,4359	100 >	11,5	18° > 758 >	0,37793	+ 2,7 >	
4	0,5160	0,5392	100 >	15,28	18° > 758 >	0,5240	+ 1,5 >	
5	0,3172	0,3502	100 >	9,4	19° > 737 >	0,3129	— 1,3 >	
6	0,3169	0,3518	200 >	18,8	19° > 737 >	0,3129	— 1,3 >	
7	0,4163	0,4378	100 >	12,66	19° > 737 >	0,4216	+ 1,3 >	
8	0,2904	0,3006	50 >	4,35	18° > 740 >	0,2970	+ 2,3 >	
9	0,2690	0,2783	100 >	4,04	18° > 740 >	0,2758	+ 2,5 >	
10	0,5733	0,6059	100 >	17,8	22° > 754 >	0,5993	+ 4,5 >	{ Endpunkt nach Hopkins-Folin schwer zu erkennen.
11	0,6729	0,7551	100 >	20,52	22° > 754 >	0,6894	+ 2,4 >	
12	0,5447	0,6275	100 >	27,33	21,5° > 740 >	0,5720	+ 5,0 >	
13	0,3601	0,4454	100 >	11,00	21,5° > 740 >	0,3633	+ 0,9 >	
14	0,4842	0,5136	100 >	14,62	20° > 748 >	0,4930	+ 1,8 >	
15	0,5784	0,6129	100 >	17,6	19° > 752 >	0,5988	+ 3,5 >	
16	0,8126	nicht bestimmt	50 >	12,16	18° > 740 >	0,8304	+ 2,2 >	
17	0,7308		100 >	22,27	20° > 748 >	0,7512	+ 2,8 >	
18	0,6946		100 >	21,00	23° > 753 >	0,7064	+ 1,7 >	

essigsäurem Ammon zur Abscheidung der Harnsäure versetzten Harnes konnte nach dem Ansäuern mit Salzsäure und weiterem Zusatze von essigsäurem Ammon selbst nach mehrstündigem Stehen keine Spur einer Harnsäureabscheidung constatirt werden.

Versuch II. Die volumetrische Bestimmung der Harnsäure in 100 ccm. eines alkalisch gemachten Harnes ergab: 11,2 ccm. N bei 18° und 747 mm. B.

Zu 100 ccm. dieses alkalisch gemachten Harnes wurden hinzugefügt 0,1046 g Harnsäure.

In der aus diesen 100 ccm. Harn abgeschiedenen Harnsäure wurden gefunden:

Harnsäure volumetrisch 42,3 ccm. N bei 18° C. und 747 mm. B.

Somit als Differenz des Stickstoffes gefunden:

31,1 ccm. bei 18° C. und 747 mm. B. =

$31,1 \times 0,003395 = 0,1055$ g Harnsäure

Thatsächlich zugefügt 0,1046 „

Differenz 0,0009 g Harnsäure.

Aus vorstehenden Beleganalysen ergibt sich, dass die neue volumetrische Methode für die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harne vollkommen geeignet ist und an Exactheit von keiner der üblichen Methoden übertroffen wird.

Was die Differenzen der volumetrischen Methode gegenüber der Ludwig-Salkowski'schen Methode betrifft, so ist aus vorstehend angeführter Tabelle ersichtlich, dass meine Methode — wenn man das Mittel aus allen Differenzen zieht — gegenüber dieser ein Plus von 2% ergibt. Dies steht in vollständiger Uebereinstimmung mit Ludwig's eigener Angabe, dass nach seiner Methode von abgewogenen Harnsäuremengen ca. 2% der Bestimmung entgehen.

Die Formel für die Berechnung der Harnsäure aus dem abgelesenen N-Volumen lautet:

$$X = V \frac{3 (b-w) 1,2540}{760 (1 + 0,00366 t)}, \text{ wobei}$$

X die Harnsäuremenge in Milligrammen,

V die abgelesenen Cubikcentimeter Stickstoff,

b der Barometerstand,

t die Temperatur und

w die dieser Temperatur entsprechende Tension des Wasserdampfes bedeuten.

Zur Vereinfachung liegt dem Apparate nachstehende Tabelle¹⁾ bei, welche die Benützung der Formel überflüssig

¹⁾ Zwischen den in der Tabelle berücksichtigten Barometerständen und Temperaturen liegende Werthe können durch Interpolation leicht berechnet werden.

macht, indem man die Zahl der abgelesenen Cubikcentimeter mit dem Factor der Tabelle, welcher dem beobachteten Druck und Temperatur entspricht, multiplicirt und so direkt die Milligramme Harnsäure pro Liter Harn erhält.

Voraussetzung ist selbstverständlich, dass 100 ccm. Harn verwendet wurden. Würde eine andere Harnmenge — etwa n ccm. — in Arbeit genommen, so ist das Resultat mit $\frac{100}{n}$ zu multipliciren.

Tabelle zur Harnsäurebestimmung.

1 ccm. Stickstoff entspricht g Harnsäure im Liter.

Bei Entnahme von 50 oder 200 ccm. sind die Zahlen mit 2 resp. 4 zu multipliciren.

Harnsäure- grad	10°	12°	14°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	25°
700	0,0330	0,0327	0,0324	0,0321	0,0320	0,0318	0,0317	0,0315	0,0313	0,0312	0,0310	0,0307
2	0,0331	0,0328	0,0325	0,0322	0,0320	0,0319	0,0317	0,0316	0,0314	0,0313	0,0311	0,0309
4	0,0332	0,0329	0,0326	0,0323	0,0321	0,0320	0,0318	0,0317	0,0315	0,0314	0,0312	0,0310
6	0,0333	0,0330	0,0327	0,0324	0,0322	0,0321	0,0319	0,0318	0,0316	0,0315	0,0313	0,0311
8	0,0334	0,0331	0,0328	0,0325	0,0323	0,0322	0,0320	0,0319	0,0317	0,0316	0,0314	0,0311
710	0,0335	0,0332	0,0329	0,0326	0,0324	0,0323	0,0321	0,0320	0,0318	0,0317	0,0315	0,0311
2	0,0336	0,0333	0,0330	0,0327	0,0325	0,0324	0,0322	0,0320	0,0319	0,0317	0,0316	0,0311
4	0,0337	0,0334	0,0331	0,0328	0,0326	0,0325	0,0323	0,0321	0,0320	0,0318	0,0317	0,0311
6	0,0338	0,0335	0,0332	0,0329	0,0327	0,0326	0,0324	0,0322	0,0321	0,0319	0,0317	0,0311
8	0,0339	0,0336	0,0333	0,0330	0,0328	0,0326	0,0325	0,0323	0,0322	0,0320	0,0318	0,0311
720	0,0340	0,0337	0,0334	0,0331	0,0329	0,0327	0,0326	0,0324	0,0323	0,0321	0,0319	0,0311
2	0,0341	0,0338	0,0335	0,0332	0,0330	0,0328	0,0327	0,0325	0,0323	0,0322	0,0320	0,0311
4	0,0342	0,0338	0,0335	0,0332	0,0331	0,0329	0,0328	0,0326	0,0324	0,0323	0,0321	0,0311
6	0,0342	0,0339	0,0336	0,0333	0,0332	0,0330	0,0329	0,0327	0,0325	0,0324	0,0322	0,0311
8	0,0343	0,0340	0,0337	0,0334	0,0333	0,0331	0,0329	0,0328	0,0326	0,0325	0,0323	0,0311
730	0,0344	0,0341	0,0338	0,0335	0,0334	0,0332	0,0330	0,0329	0,0327	0,0326	0,0324	0,0311
2	0,0345	0,0342	0,0339	0,0336	0,0335	0,0333	0,0331	0,0330	0,0328	0,0326	0,0325	0,0311
4	0,0346	0,0343	0,0340	0,0337	0,0335	0,0334	0,0332	0,0331	0,0329	0,0327	0,0326	0,0311
6	0,0347	0,0344	0,0341	0,0338	0,0336	0,0335	0,0333	0,0332	0,0330	0,0328	0,0327	0,0311
8	0,0348	0,0345	0,0342	0,0339	0,0337	0,0336	0,0334	0,0332	0,0331	0,0329	0,0328	0,0311
740	0,0349	0,0346	0,0343	0,0340	0,0338	0,0337	0,0335	0,0333	0,0332	0,0330	0,0329	0,0311
2	0,0350	0,0347	0,0344	0,0341	0,0339	0,0338	0,0336	0,0334	0,0333	0,0331	0,0329	0,0311
4	0,0351	0,0348	0,0345	0,0342	0,0340	0,0338	0,0337	0,0335	0,0334	0,0332	0,0330	0,0311
6	0,0352	0,0349	0,0346	0,0343	0,0341	0,0339	0,0338	0,0336	0,0335	0,0333	0,0331	0,0311
8	0,0353	0,0350	0,0347	0,0344	0,0342	0,0340	0,0339	0,0337	0,0335	0,0334	0,0332	0,0311
750	0,0354	0,0351	0,0348	0,0345	0,0343	0,0341	0,0340	0,0338	0,0336	0,0335	0,0333	0,0311
2	0,0355	0,0352	0,0349	0,0346	0,0344	0,0342	0,0341	0,0339	0,0337	0,0336	0,0334	0,0311
4	0,0356	0,0353	0,0350	0,0347	0,0345	0,0343	0,0341	0,0340	0,0338	0,0337	0,0335	0,0311
6	0,0357	0,0354	0,0350	0,0347	0,0346	0,0344	0,0342	0,0341	0,0339	0,0338	0,0336	0,0311
8	0,0358	0,0355	0,0351	0,0348	0,0347	0,0345	0,0343	0,0342	0,0340	0,0338	0,0337	0,0311
760	0,0359	0,0356	0,0352	0,0349	0,0348	0,0346	0,0344	0,0343	0,0341	0,0339	0,0338	0,0311
2	0,0360	0,0356	0,0353	0,0350	0,0349	0,0347	0,0345	0,0344	0,0342	0,0340	0,0338	0,0311
4	0,0361	0,0357	0,0354	0,0351	0,0350	0,0348	0,0346	0,0344	0,0343	0,0341	0,0339	0,0311
6	0,0362	0,0358	0,0355	0,0352	0,0350	0,0349	0,0347	0,0345	0,0344	0,0342	0,0340	0,0311
8	0,0363	0,0359	0,0356	0,0353	0,0351	0,0350	0,0348	0,0346	0,0345	0,0343	0,0341	0,0311
770	0,0364	0,0360	0,0357	0,0354	0,0352	0,0351	0,0349	0,0347	0,0346	0,0344	0,0342	0,0311

Ueber eine durch Fütterung mit Ammoniumsulfat erzeugte chemische Veränderung des Blutes.

Von

Th. Rumpf und O. Schumm in Hamburg.

(Aus dem Laboratorium des Neuen Allg. Krankenhauses.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Februar 1900.)

In einem Vortrag auf dem XV. Congress für innere Medizin 1897 hat Rumpf¹⁾ schon darauf hingewiesen, dass in Krankheitsfällen eine beträchtliche Verarmung des Blutes an freien resp. an organische Säuren gebundenen Alkalien stattfinden kann. Auf der Naturforscherversammlung in München hat derselbe sodann verschiedene von Prof. Dennstedt und dem Vortragenden erhobene Befunde mitgeteilt.²⁾ In einer gemeinschaftlichen experimentellen Untersuchung von Th. Rumpf und G. Kleine³⁾ hat sich weiterhin ergeben, dass die in den Körper eingeführten anorganischen Ammonsalze alsbald eine Spaltung in den Säurecomponenten und Ammoniakcomponenten unter anderweiter Bindung erfahren. Da der Säurecomponent rascher zur Ausscheidung gelangte, als der Ammoniakcomponent, so musste die Ausscheidung der Säure eine stärkere Ausscheidung von Alkali im Gefolge haben und bei länger dauernder Zufuhr eines anorganischen Ammoniumsalzes war zu erwarten, dass diese stärkere Ausscheidung zu einer deutlich nachweisbaren Verarmung des Blutes an Alkali führen werde.

1) Verhandlungen des Congr. f. inn. Med. 1897. S. 358.

2) Die ausführliche Arbeit wird demnächst erscheinen.

3) Zeitschr. f. Biologie Bd. 34 N. F. XVI.

Um die Richtigkeit dieser Anschauung zu erproben, wurde die Hündin (II), welche schon früher als Untersuchungsobject gedient hatte, dazu ausersehen, zu einer Fleisch-Fettnahrung täglich eine Menge von Ammonium sulfuricum zu erhalten, welche eben ertragen wurde. Nach mannigfachen Vorversuchen zeigte sich, dass 6 g Ammonium sulfuricum ohne Schwierigkeit in dem Futter genommen, grössere Mengen mit dem Futter refüsirt wurden.

Die Zufuhr begann bei der 27 Pfund schweren Hündin am 18. April 1896, während ein zweiter gleichschwerer Hund dasselbe Futter ohne Ammonium sulfuricum erhielt. Bis zum 12. Juli war der Ammoniakhund ganz gesund und munter. Abgesehen von der Essenszeit bewegte sich die Hündin frei im Stall jedoch so, dass ihr anderes Futter nicht zugänglich war. Am 12. Juli trat ein Brechdurchfall auf, wodurch die Zufuhr von Ammonium sulfuricum einige Tage unmöglich wurde. Am 26. Juli warf die Hündin sieben Junge, wodurch die Zufuhr des Salzes wiederum bis zum 6. August unterbrochen wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte die Hündin 660 g Ammonium sulfuricum eingenommen. Es wurde nun in der seitherigen Weise bis zum 10. Juli 1899 mit nur seltenen Unterbrechungen fortgeführt. Zu letzteren gehörte eine weitere Schwangerschaft, welcher am 16. September 1897 sechs weitere Junge entstammten. Von October 1897 an bis Juli 1899, also $1\frac{3}{4}$ Jahr, dauerte die Zufuhr von Ammonium sulfuricum in der gleichen Menge fast ununterbrochen fort, und dürfte die Hündin mit Berücksichtigung seltener Unterbrechung durch zeitweise Zurückweisung des Futters an 4—5000 g Ammonium sulfuricum verzehrt haben.

Wir entschlossen uns im Juli 1899 zur Tödtung der Hündin, weil dieselbe in der letzten Zeit anfang, einen kranken Eindruck zu machen. Die früher lustige Hündin wurde träge, lag in der Ecke, kam ungern heraus, nahm schlecht Nahrung und machte ohne wesentliche Gewichtsänderung einen schwammigen Eindruck. Vom 10.—14. Juli wurde nochmals eine Urinuntersuchung vorgenommen, nachdem die Ammoniakzufuhr am 9. Juli sistirt war:

Datum		Menge in ccm.	NH ₃ in g	SO ₃ in g	P ₂ O ₅ in g
Juli	10	166	1,41	1,06	0,75
	11	131	0,77	1,19	0,68
	12	194	0,50	0,82	1,07
	13	216	2,03	0,76	0,76
	14	99	1,01	0,93	1,03

Diese Untersuchung ergibt eine tägliche Vermehrung der Ammoniakausscheidung gegenüber den bei dem gleichen Hund erhobenen Normalwerthen um 0,722 g (normal 0,418 g) der SO₃-Ausscheidung auf etwa das Doppelte und eine nicht ganz so hohe, aber doch beträchtliche Vermehrung der P₂O₅-Ausscheidung. Auch hier zeigt sich wieder, dass nach dem Aussetzen der Zufuhr von Ammonium sulfuricum die Säurewerthe rascher sinken als die NH₃-Werthe.

Am 15. Juli 1899 wurde die Hündin nach einer Morphinum-injection und leichter Chloroformirung in der Art getödtet, dass nach erfolgter Fesselung die Aorta abdominalis freigelegt und vorsichtig eröffnet wurde. Solange ein kräftiger Strahl aus dem Gefäss sich ergoss, was nur wenige (etwa 3) Minuten dauerte, wurde das Blut aufgefangen. Dann wurde die Obduction ausgeführt, aus welcher Folgendes bemerkenswerth ist.

Das Fettpolster ist sehr weich, die Muskulatur schwach und blassroth; beim Eröffnen der Bauchhöhle fällt ein penetranter scharfer Geruch auf. Das Herz ist ziemlich gross, der linke Ventrikel hypertrophisch. Die Leber ist gross, blass mit deutlicher Acinuszeichnung, deren Centrum eingesunken und hyperämisch ist; die Messerschneide zeigt feinste Fetttröpfchen.

Die Nierenkapsel ist leicht abziehbar, die Oberfläche ist glatt, glänzend, dunkelroth; die Nieren sind weder vergrössert noch verkleinert, aber auf der Oberfläche mit zahllosen, kleinen weissen, stecknadelkopfgrossen und kleineren Herden durchsetzt; die Marksubstanz ist blass, keine Glomeruluszeichnung.

Die mikroskopische Untersuchung der Nieren ergibt Folgendes: die Glomeruli sind klein, in einer grossen

Anzahl derselben ist Exsudat vorhanden und die Kerne der Schlingen lassen sich nur schlecht färben. In den gewundenen Harnkanälchen finden sich spärliche Cylinder und daneben im interstitiellen Gewebe eine geringe kleinzellige Infiltration. Den kleinen Herden auf der Oberfläche scheinen die theilweise mit Exsudat angefüllten Glomeruli zu entsprechen; die weisse Farbe derselben ist nach der Härtung und der Behandlung mit Alkohol, Formol, Farblösung, Xylol und Bergamottöl verschwunden; vermuthlich haben Niederschläge von Ammoniumsalzen in den Glomeruli sich wieder gelöst.

Die mikroskopische Untersuchung der Leber zeigt die Acini im Centrum mit Blut vollgepfropft, während die Peripherie eine fettige Infiltration mit kleineren und grösseren Fetttropfchen zeigt.

Bei der Schwierigkeit, Blutkörperchen und Serum leicht zu trennen, und der Unmöglichkeit, bei längerem Stehen Diffusionsvorgänge auszuschliessen, haben wir auf eine Trennung verzichtet, zumal die Frage auf die chemische Zusammensetzung des gesammten Blutes sich bezog.

Das Blut wurde in gewogenen Gefässen aufgefangen, und zwar einige kleine Proben in mit Seesand versehenen Glasschälchen. Letztere Proben dienten zur H_2O -Bestimmung. Die verschlossenen Gefässe wurden unmittelbar darauf wieder gewogen.

Die Gefässe wurden sodann in einen Vacuum-Trockenschrank¹⁾ gebracht und in möglichst sauerstoffreier Luft bei etwa 75° vorgetrocknet. Die Proben zur H_2O -Bestimmung wurden bei 100° bis zur Gewichtsconstanz weiter getrocknet. Die N-Bestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt, unter Anwendung des frischen Blutes.

Das bei 75° im Vacuum-Schrank vorgetrocknete Blut wurde (in einer Porzellanreibeschaale) in ein möglichst feines Pulver verwandelt und gemischt. Der H_2O -Gehalt dieses Pulvers wurde noch für sich bestimmt, um die Aufnahme von

1) J. Kőnig, Chemie der menschl. Nahrungs- und Genussmittel 1893, II. Theil, S. 3.

Feuchtigkeit während der Operation des Pulverisirens zu controlliren. Von dem fertigen Pulver wurde sofort die erforderliche Anzahl von Proben für sämtliche Analysen abgewogen.

Diese Bestimmung von $K + Na$ wurde in der von J. Katz¹⁾ angegebenen Weise, die Trennung des K vom Na nach Fresenius²⁾ ausgeführt.

Cl wurde ebenfalls nach J. Katz, und zwar gewichtsanalytisch, bestimmt.

Die Ca- und Fe-Bestimmungen wurden nach der von Hoppe-Seyler³⁾ gegebenen Anweisung ausgeführt.

Die Untersuchung der Leber geschah in entsprechender Weise wie die des Blutes. Bei der Fettbestimmung wurden die von Voit⁴⁾ angegebenen Cautelen angewandt.

Von sämtlichen Analysen wurden Kontrollbestimmungen ausgeführt und das Mittel aus zwei gut übereinstimmenden Analysen genommen.

Blutanalyse:	Leberanalyse:
1000 Theile Blut enthalten:	1000 Theile enthalten:
H ₂ O 770,3	H ₂ O 692,1
N 33,5	Fett 21,6
K 0,393	K 2,58
Na 2,480	Na 0,83
Cl 4,180	Cl 0,77
Ca 0,076	
Fe 0,566	

Betrachtung der Blutanalyse.

Zur Bindung des vorhandenen Cl sind erforderlich:

an Na	2,708
vorhanden sind an Na	2,480
Differenz Na	— 0,228

1) J. Katz, Die mineralischen Bestandtheile des Muskelfleisches. Inaug. Diss. Bonn. 1896.

2) Fresenius, Quantitative Analyse.

3) Hoppe-Seyler, Handbuch d. physiol. u. pathol.-chemischen Analyse. 1893.

4) C. Voit, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung u. s. w., Zeitschr. f. Biol., Bd. 37, S. 555.

Zur Bindung des Cl sind weiter erforderlich:

an K 0,388
 vorhanden sind an K 0,393
 Differenz an K + 0,005

Naturgemäss war es unsere Absicht, einen Kontrollhund, der in gleicher Weise mit Fett und Fleisch gefüttert war, in derselben Weise zu tödten und Blut und Leber in gleicher Weise zu analysiren. Wir behalten uns diese Untersuchung besonders in Rücksicht auf die Leber vor. In der Zwischenzeit sind aber aus dem Laboratorium von Prof. G. v. Bunge in Basel von Emil Abderhalden¹⁾ Analysen des Blutes verschiedener Thierarten veröffentlicht worden, unter welchen sich auch zwei Analysen von Hundeblood befinden. Diese letzteren ergeben bei Umrechnung von Kali und Natron in die Elemente

in 1000 Theilen Blutes:			
	I. Hund	II. Hund	Mittel
Wasser:	810,05	792,01	—
K	0,208	0,214	0,211
Na	2,727	2,713	0,720
Cl	2,935	2,908	2,922
Ca	0,044	0,035	0,040
Fe	0,449	0,409	0,429

Demgemäss ergibt sich folgende Rechnung:

Zur Bindung des vorhandenen Cl sind erforderlich:

Na 1,893
 vorhandenes Na 2,720
 Differenz an Na + 0,827
 weiter vorhanden an K + 0,211

Es ist somit bei diesen Hunden ein beträchtlicher Ueberschuss an Alkali gegenüber dem Chlor vorhanden. Auch die übrigen untersuchten Thierarten zeigen einen ähnlichen hohen Natriumgehalt; dieser reicht nicht nur aus, das vorhandene Chlor zu decken, sondern ergibt ein Plus an freiem resp. anderweitig gebundenem Natrium.

Vergleichen wir damit den Blutbefund bei unserem Ammoniakhund, so ist bei geringerem Wassergehalt der

¹⁾ E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 88 u. 95.

Chlorgehalt ein wesentlich höherer; der Gehalt an Natrium ist geringer und reicht bei Weitem nicht aus, das vorhandene Chlor zu binden. Um dieses zu binden, ist sogar der grösste Theil des vorhandenen Kaliums erforderlich. Während somit bei dem normalen Hunde Abderhalden's fast 1 g Natrium + Kalium frei oder zu anderweitiger Bindung in 1000 g Blutes zur Verfügung stehen, beträgt bei dem Ammoniakhund die Menge nur 0,005 g. Im Gegensatz zu dieser Verarmung an Natrium und Kalium ist der Calciumgehalt des Blutes nahezu auf das Doppelte erhöht.

Von weiterem Interesse dürfte ferner die Glomerulonephritis sein; wir könnten vielleicht Bedenken tragen, hieraus allgemeine Schlüsse zu ziehen, wenn wir nicht in einem anderen Fall einjähriger Fütterung eines Hundes mit phosphorsaurem Ammonium ebenfalls deutliche entzündliche Herde in der Niere gefunden hätten.

Der hauptsächlichste Befund dürfte aber nach mehrjähriger Fütterung mit Ammonium sulfuricum die Verarmung des Blutes an freiem resp. organisch gebundenem Natrium sein, welche mit einer gleichzeitigen Erhöhung des Chlornatrium- und des Calciumgehaltes und einer Verminderung des Wassergehaltes des Blutes einhergeht.

Es erübrigt noch, einiger möglichen Einwendungen zu gedenken. Dass die 1³/₄ Jahr vor dem Tod stattgehabte letzte Schwangerschaft die chemische Veränderung des Blutes bedingt hat, ist wohl kaum anzunehmen. Wohl aber bedarf die Frage der Erwägung, ob nicht die bestehende Nephritis zu der Veränderung des Blutes geführt hat, nachdem sich in Untersuchungen von Bohne¹⁾ bei Urämie eine Vermehrung des Chlors im Blute gefunden zu haben scheint. Indessen sind bei unserem Hunde die Veränderungen an den Nieren noch ganz im Beginn, so dass wir beide Erscheinungen, die Veränderung der Nieren und die Blutveränderung, als Folge der Fütterung mit Ammonium sulfuricum ansehen zu müssen glauben.

1) Fortschritte der Medizin 1897, S. 121.

Ueber den Nachweis gepaarter Glucuronsäuren und ihr Vorkommen im normalen Harn.

Von

P. Mayer und C. Neuberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1900.)

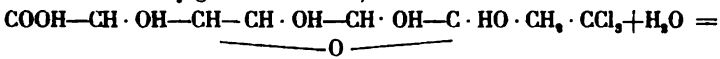
Der Nachweis der Glucuronsäure, dem man in jüngster Zeit auch ein klinisch-diagnostisches Interesse entgegenzubringen beginnt, ist bis vor Kurzem mit ausserordentlichen Schwierigkeiten verbunden gewesen.

Wenn es sich darum handelte, nach Zufuhr von Substanzen, die sich mit der Glucuronsäure paaren, die Anwesenheit der betreffenden gepaarten Glucuronsäuren im Harn zu erweisen, war man daher darauf angewiesen, diese Glucuronsäureverbindungen direkt aus dem Harn darzustellen, ein Verfahren, das in den meisten Fällen recht mühevoll ist und überhaupt nur dann gelingen kann, wenn sich grössere Mengen der betreffenden Substanz im Harne vorfinden. Ein italienischer Autor Vitali¹⁾ hat vor kurzem den Versuch gemacht, dieses Verfahren in einem speciellen Falle zu vereinfachen.

Der nach Chloralhydratgenuss Urochloralsäure enthaltende Harn wird zum Nachweis dieser Säure erst auf die Hälfte seines Volumens eingeeengt und dann mit Bleiacetat und Ammoniak ausgefällt. Der Niederschlag, in dem sich urochloralsaures Blei befindet, wird nach gehörigem Auswaschen mit Wasser durch Schwefelsäure zersetzt und das nunmehr freie Urochloralsäure enthaltende Filtrat mit Zinkpulver und

¹⁾ Dioscoride Vitali, Boll. Chim. Farm. 38, 377—380.

verdünnter Schwefelsäure am Rückflusskühler gekocht. Dabei wird die Urochloralsäure, entsprechend ihrer Zusammensetzung als Trichloräthylglucuronsäure, nach der Formel:



$\text{COOH}-\text{CH} \cdot \text{OH}-\text{CH} \cdot \text{OH}-\text{CH} \cdot \text{OH}-\text{CH} \cdot \text{OH}-\text{CHO} + \text{CH}_2 \cdot \text{OH} \cdot \text{CCl}_3$,
in Glucuronsäure und Trichloräthylalkohol gespalten, und gleichzeitig wird letzterer Alkohol zum gewöhnlichen Alkohol reducirt, den man nach dem Abdestilliren mittelst der üblichen Reactionen erkennen kann.

Wollte man auf dieses Verfahren, das auf einer Charakterisirung des Paarlings beruht, Methoden für den Nachweis der Glucuronsäure im Harn gründen, dann müsste zu diesem Zweck für jede einzelne der gepaarten Glucuronsäuren eine besondere Vorschrift ausgearbeitet werden, die in vielen Fällen schliesslich nicht einfacher sein kann, als die Darstellung der betreffenden gepaarten Glucuronsäure selbst.

Viel rationeller erscheint es, den allen gepaarten Glucuronsäuren gemeinsamen Paarling, die Glucuronsäure, nachzuweisen. Der eine¹⁾ von uns hat nun in einer früheren Arbeit bereits zum Nachweis der Glucuronsäure im Harn einen Weg angegeben, welcher darin besteht, den Harn behufs Spaltung der gepaarten Glucuronsäure mit verdünnter Schwefelsäure zu erhitzen. Dabei geht die anfängliche Linksdrehung allmählich in eine Rechtsdrehung über und der Harn gibt nach der Spaltung die Orcinsalzsäurereaction, welche in dem ungespaltenen Harn negativ ausfällt.

Diese einfache Methode wird zwar in den meisten Fällen für den klinischen Bedarf ausreichen, doch besitzt sie unzweifelhaft eine gewisse Unvollkommenheit und kann unter Umständen versagen.

Erstens liegt nämlich die Möglichkeit vor, dass der bei der Spaltung der stets linksdrehenden gepaarten Glucuronsäuren mit verdünnter Schwefelsäure abgetrennte Paarling auch optische Activität besitzt, Fälle, die bei den Campher-, Men-

¹⁾ P. Mayer, Berlin. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 27 und 28.

thol- und Terpenglucuronsäuren, überhaupt nach Genuss zahlreicher activer Substanzen eintreten können. Da man nun über die Menge der gepaarten Glucuronsäuren in dem zu untersuchenden Harn fast niemals, über ihre Art auch nicht immer unterrichtet ist,¹⁾ befindet man sich in der Nothwendigkeit, die spaltende Wirkung der verdünnten Schwefelsäure eine Zeit andauern zu lassen, die man nur nach der Erfahrung bemessen kann, und deren Länge entsprechend der ungleich leichten Spaltbarkeit der gepaarten Glucuronsäuren eine recht verschiedene ist.

Dabei kann es nun vorkommen, dass einmal die Drehungsrichtungen von Glucuronsäure und Paarling entgegengesetzt sind und scheinbare Inactivität erzeugen, ferner kann es sich ereignen, dass beide Componenten die Ebene des polarisirten Lichts im gleichen Sinne ablenken und so durch eine gesteigerte Rechtsdrehung einen zu hohen Glucuronsäuregehalt vortäuschen.

Ausserdem tritt der störende Umstand hinzu, dass sich die Flüssigkeit bei der Spaltung mit Schwefelsäure in Folge der namentlich in unreinen Lösungen, wie Harn, recht erheblichen Empfindlichkeit der Glucuronsäure so dunkel färbt, dass eine Untersuchung am Polarisationsapparat unmöglich ist; mit Thierkohle findet zwar Entfärbung statt, aber ihre Anwendung ist nicht ratsam, da viel Glucuronsäure zurückgehalten und das Resultat dadurch bei geringer Concentration bis zur Unkenntlichkeit entstellt wird.

Was die Orcinsalzsäurereaction betrifft, so beweist zwar der positive Ausfall derselben nach der Spaltung mit Säure im Gegensatz zu dem negativen Ergebniss der Probe im ursprünglichen Harn stets das Vorhandensein von gepaarten Glucuronsäuren. Aber auch diese Probe kann unter Umständen im Stich lassen, da, wie aus den weiteren Versuchen des einen von uns²⁾ hervorgeht, bei sehr leicht spaltbaren gepaarten

¹⁾ Selbst aus einer ausgesprochenen Linksdrehung des nativen Harns kann man nicht auf die Menge der gepaarten Glucuronsäuren schliessen, da die specifische Drehung für nur wenige derselben ermittelt ist.

²⁾ P. Mayer, Berlin. klin. Wochenschr., 1900, Nr. 1.

Glucuronsäuren bisweilen schon vor dem Erhitzen des Harns mit Säure die Orcinreaction positiv ausfallen kann. Ueberdies ist die Orcinsalzsäurereaction von einer solchen Empfindlichkeit, dass die Stärke ihres Ausfalls keinen Schluss auf die wirklich vorhandenen Glucuronsäuremengen gestattet.

Bei dieser Sachlage war die Ueberführung der Glucuronsäure in ein charakteristisches, auch aus unreinen Lösungen erhältliches Produkt der einzige Weg, auf welchem man erfolgreich ihre Erkennung gründen konnte.

Von den bisher bekannten Verbindungen der Glucuronsäure könnte nur ihr basisches Baryumsalz für den erwähnten Zweck in Betracht kommen; aber seine Gewinnung fällt ziemlich mit der nicht leichten Reindarstellung der Glucuronsäure zusammen, ermöglicht ausserdem nur im Verein mit den anderen Eigenschaften der Glucuronsäure, optischer Activität, Reductionerscheinungen und Gährungsunvermögen, ihren sicheren Nachweis.¹⁾

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, das Erkennungsmittel *par excellence* in der Reihe der Kohlehydrate, zu denen ja auch die Glucuronsäure als Carbonsäure einer Pentose zu zählen ist, das Phenylhydrazin, zur Abscheidung der Glucuronsäure in Anwendung zu bringen. Es hat sich aber gezeigt, dass unter verschiedenen Bedingungen, deren Einhaltung man nicht in der Hand hat, die einzelnen Autoren²⁾ zu ausserordentlich abweichenden³⁾ Resultaten gelangt sind. Diese kann man dahin zusammenfassen, dass je nach Anwendung von freier Säure, Lacton oder Salz mit ausserordentlich wechselnder Aus-

1) Siehe Huppert, Analyse des Harns, 1898, 10. Aufl., S. 204.

2) Thierfelder, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 11, S. 395. Geyer, Wiener Med. Presse, 1889, S. 1686. Hirschl, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 24, S. 579 u. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, S. 381. P. Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIX, S. 59. Tollens und Widtsoe, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 33, S. 142.

3) So hat Thierfelder bei Verwendung eines Alkalisalzes der Säure eine Phenylhydrazinverbindung erhalten, welche bei 114–115° schmilzt und eine complicirte Zusammensetzung zeigt. Ferner konnte vor Kurzem der Eine von uns (P. Mayer) feststellen, dass die Glucuronsäure mit dem Phenylhydrazin noch zwei andere Verbindungen liefert

beute, die bis auf Null sinken kann, Hydrazinverbindungen erhalten werden, die bald amorph, bald krystallinisch, verschiedene Schmelzpunkte zwischen 114° und 220° aufweisen und zumeist aus Gemischen der zahlreich möglichen Verbindungsformen, wie Hydrazon, Osazon, Hydrazid, Hydrazonhydrazid, Osazonhydrazid und Condensationsprodukten bestehen. Sie sind in Folge ihrer variirenden Zusammensetzung nicht nur durch die Analyse nicht zu identificiren, also zum Nachweis ungeeignet, sondern geben in Folge ihrer Schmelzpunkte leicht zu Täuschungen Anlass.

Daher beschäftigte sich der eine von uns auf Veranlassung des Herrn Prof. E. Salkowski mit der Einwirkung substituierter Hydrazinbasen auf die Glucuronsäure und fand dabei im p-Bromphenylhydrazin¹⁾ ein zur Abscheidung der Glucuronsäure vortrefflich geeignetes Mittel. Beide Substanzen verbinden sich nämlich zu einer von der Concentration der Lösung und dem Verhältniss der Mengen von Glucuronsäure zu p-Bromphenylhydrazin unabhängigen Verbindung von der Zusammensetzung, $C_{13}H_{17}O_7N_2Br$, die aus der freien Säure wie ihren wasserlöslichen Salzen in essigsaurer Lösung, aber unter Vermeidung eines Ueberschusses an freier Essigsäure in guter Ausbeute entsteht. Die Verbindung, deren Zusammensetzung unter allen Umständen der angeführten Formel entspricht und wahrscheinlich glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin von der Formel



darstellt, ist in Wasser unlöslich, scheidet sich daher sehr vollständig aus, ist leicht durch Waschen mit Alkohol zu reinigen und zeigt als Rohprodukt den Schmelzpunkt ca. 200—216°, nach etlichem Umkrystallisiren aus 60%igem Alkohol 236°. Diesen Grad der Reinheit braucht man aber

je nach der Anzahl der Moleküle Phenylhydrazin, die man auf das Glucuronsäuremolekül einwirken lässt, Verbindungen, welche in Folge ihrer Schmelzpunkte von 159°, bezw. 205° zur Verwechslung mit Pentosazon und Hexosazon führen könnten, aber wahrscheinlich keine einheitlichen Körper darstellen.

1) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 32, S. 2395—2398.

nicht zum Zwecke der Erkennung zu erreichen, sondern es trifft sich günstig, dass bei dem von einem von uns¹⁾ jüngst empfohlenen Pyridinverfahren für die Bestimmung der optischen Drehungsrichtung der Osazone die Verbindung der Glucuronsäure mit p-Bromphenylhydrazin eine ausgesprochene Sonderstellung unter den Hydrazinverbindungen aller in Betracht kommenden Kohlehydrate einnimmt und dem schon recht reinen Rohprodukt vom Schmelzpunkt ca. 200—216° die gleiche Drehung wie der absolut reinen Substanz vom Schmelzpunkt 236° zukommt.

Löst man nämlich je 0,20 g Hydrazinverbindung in 4,0 ccm. gereinigten Pyridins und 6,0 ccm. absoluten Alkohols,²⁾ so erhält man im Laurent'schen Halbschattenapparat bei Natriumlicht folgende Drehungen:

l-Arabinosephenylosazon	+ 1° 10'
l-Arabinose-p-bromphenylosazon	+ 0° 28'
l-Xylosephenylosazon	— 0° 15'
l-Xylose-p-bromphenylosazon	± 0°
Rhamnosephenylosazon	+ 1° 24'
d-Glucosephenylosazon	— 1° 30'
d-Glucose-p-bromphenylosazon	— 0° 31'
d-Galactosephenylosazon	+ 0° 48'
Sorbinosephenylosazon	— 0° 15'
Maltosephenylosazon	+ 1° 30'
Lactobiosephenylosazon	± 0°
Glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin ³⁾	— 7° 25'

Man kann also die Glucuronsäure ohne Elementaranalyse durch die schnell ausführbare optische Bestimmung ihrer Bromphenylhydrazinverbindung mit absoluter Sicherheit erkennen

1) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. 32, S. 3384—3388.

2) Genauere Angaben über die Ausführung siehe C. Neuberg, l. c.

3) Hieraus berechnet sich für diese Verbindung das abnorm hohe spezifische Drehungsvermögen von $[\alpha]_D^{20} = -369^\circ$. Da im allgemeinen die Uebertragungen der Drehungsbeträge am Kreisapparat bei D-Licht auf die Angaben empirisch geachteter Zuckerapparate für weisses Licht unzulässig sind, sobald die Lösungen, wie die der Osazone, gefärbt sind, möge hier die Drehung der Glucuronsäureverbindung bei Auerlicht in einem Saccharimeter angegeben sein. Sie ist unter den Bedingungen obiger Tabelle ungefähr gleich der einer 13,2% igen Traubenzuckerlösung.

und kann überdies die Hydrazinverbindung aus ihrer Lösung in Pyridin-Alkohol fast quantitativ durch Fällung mit Petroläther wieder abscheiden.¹⁾

Nachdem eine orientierende Bestimmung gezeigt hatte, dass sich diese an reiner Glucuronsäure gewonnenen Erfahrungen unter geeigneten Bedingungen zur Erkennung gepaarter verwenden lassen, combinirten wir unsere Methoden des Nachweises durch «Säurespaltung ohne Reindarstellung» und «Gewinnung der Bromphenylhydrazinverbindung». Dieses Verfahren ermöglichte es uns, den Nachweis der gepaarten Glucuronsäuren im Harn nicht nur in pathologischen Fällen, zu erbringen, sondern deren Anwesenheit als integrierenden Bestandteil im normalen Harn mit völliger Sicherheit zu erkennen. Da die Ausbeuten an p-Bromphenylhydrazinverbindung aus reiner Glucuronsäurelösung etwa 80—85% betragen, ermöglicht dieses Verfahren im Gegensatz zu dem Nachweis durch die Orcinsalzsäurereaction einen, wenn auch rohen Schluss auf die Quantität der gepaarten Glucuronsäuren.

Die im folgenden beschriebenen Versuche sind alle mit menschlichem Harn angestellt.

A. Urochloralsäurehaltiger Harn.

Fünf Liter Harn, welche nach Zufuhr von 6 g Chloralhydrat entleert waren, wurden auf freiem Feuer bis auf 300 ccm. eingedampft. Da die Urochloralsäure, wie bekannt, durch Bleiessig fällbar ist, wurde der eingeengte Harn mit Bleiessig ausgefällt;²⁾ der voluminöse Bleiniederschlag wurde dann mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, auf dem Filter ausgewaschen und nach Suspension in ca. 400 ccm. Wasser durch

¹⁾ Das wieder ausgefällte glucuronsaure p-Bromphenylhydrazin ist anfangs amorph und schwer filtrirbar, ballt sich aber nach einigen Tagen zu einer grobkörnigen, gut von der überstehenden Flüssigkeit trennbaren Masse zusammen.

²⁾ Hierzu waren etwa 2 Liter Bleiessig erforderlich; eine Untersuchung lehrte uns aber, dass die gesammte Urochloralsäure schon in dem durch 750 ccm. bewirkten Niederschlag vorhanden ist. Dieselbe Erfahrung konnten wir bei anderen gepaarten Glucuronsäuren machen, deren Abscheidung durch dieses Verhalten erleichtert wird.

Einleiten von Schwefelwasserstoffgas zersetzt. Nach Trennung vom ausgeschiedenen Bleisulfid und Befreiung vom gelösten Schwefelwasserstoff restirten ca. 350 ccm. einer stark sauren, schwach gelb gefärbten Flüssigkeit, die Fehling'sche Lösung intensiv reducirte, eine starke Phloroglucin-, aber keine Orcinprobe gab und eine Linksdrehung von 3%, auf Traubenzucker berechnet, zeigte. Diese Lösung wurde nun der Spaltung mit Säure unterworfen. Obgleich zwar die gepaarten Glucuronsäuren durch Erwärmen mit verdünnter Säure auf freiem Feuer gespalten werden, zogen wir es vor, dem Beispiel von Tollens und Mann¹⁾ folgend, diese Zersetzung im Autoclaven vorzunehmen, eine Operation, durch welche allgemein die Zeit der Spaltung verkürzt und die die Ausbeute an Glycuronsäure schädigende Säuremenge auf ein Mindestmass beschränkt werden kann. Als Autoclav²⁾ bedienten wir uns einer Weissbierflasche aus Steingut von ca. 1 Liter Inhalt, die beim Gebrauch ausser durch ihren gummigedichteten Patentverschluss mit einem unter diesen eingepressten Kork verschlossen wurde. Die ganze Flasche war, um bei etwaiger Zertrümmerung gegen Splitter geschützt zu sein, mit Handtüchern umwickelt und die so entstandene feste Puppe wurde dann in einem offenen Eisentopf in einer sie völlig bedeckenden Wassermenge zugleich mit dieser vorsichtig angewärmt und dann eine Stunde lang bei 100° erhalten.

In dieser Flasche behandelten wir in der angegebenen Weise unsere 350 ccm. Flüssigkeit mit 3,5 g concentrirter Schwefelsäure, d. h. mit soviel, dass die Lösung ca. 1% freie H_2SO_4 enthielt. Nach völligem Erkalten wurde nun die Flasche geöffnet; die filtrirte Lösung war vollkommen klar und hellgelb gefärbt. Sie reducirte Fehling'sche Lösung, gab höchst intensive Phloroglucin- und Orcinreaction und zeigte eine

1) Tollens und Mann, Annal. d. Chem., 290, 1896.

2) Selbstverständlich kann hierzu jeder kleine Metallautoclav benützt werden; doch hat sich diese Anordnung gut bewährt. Zu den beschriebenen und etlichen anderen Versuchen hat ein und dieselbe Flasche gedient und hat sie überstanden. Da ihr Gebrauch unter den erwähnten Vorsichtsmassregeln gänzlich ungefährlich ist, kann sie mit Vortheil zur Verarbeitung kleiner Harnmengen benützt werden.

Rechtsdrehung von 0,35 %, auf Traubenzucker berechnet. Diese Drehung entspricht etwa einem Gehalt von insgesamt 3,1 g Glucuronsäure.¹⁾

300 ccm. dieser Lösung wurden dann nach genauer Neutralisation durch Natriumcarbonat mit 8 g p-Bromphenylhydrazinacetat²⁾ behandelt und lieferten ca. 2 g Hydrazinverbindung, die als Rohprodukt den Schmelzpunkt 206° besass und durch Drehungsbestimmung (0,2 g zeigten im Pyridin-Alkoholgemisch — 7° 30') als Glucuronsäurederivat erkannt wurde.

1) Dieser Versuch zeigt, in welch reichlicher Ausbeute Urochloresäure aus Chloralhydrat erhalten werden kann. Denn nach der Theorie vermögen 165 g $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ (1 Mol.-Gew.) nach erfolgter Reduction zu Trichloräthylalkohol 194 g Glucuronsäure (1 Mol.-Gew.) zu binden oder je 1 g Chloralhydrat 1,17 g $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$. Im beschriebenen Versuch wurde aus 6 g verabreichtem Chloralhydrat 3,1 g Glucuronsäure erhalten oder, da theoretisch 7,02 g möglich wären, 43,0 % der Theorie.

2) Da einerseits die Glycuronsäure namentlich in unreiner Lösung gegen Säuren und andererseits ihre Verbindung mit p-Bromphenylhydrazin gegen den Luftsauerstoff bei Wasserbadwärme empfindlich ist, muss man einen Ueberschuss an freier Essigsäure und den Zutritt der Luft möglichst vermeiden. Ersteres erreicht man am sichersten durch Anwendung von p-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und der erforderlichen Menge Natriumacetat, letzteres dadurch, dass man über das ins Wasserbad gehängte Becherglas eine Glasschale stülpt, so dass der über der Flüssigkeit befindliche Raum hauptsächlich von Wasserdämpfen erfüllt ist. Nach etwa 10 Minuten langem Erwärmen pflegt die Krystallabscheidung zu beginnen; man unterbricht dann die Erwärmung und filtrirt sofort durch ein bereit gehaltenes Faltenfilter. Beim Erkalten erfolgt reichliche Krystallisation; der entstandene hellgelbe Niederschlag wird an der Saugpumpe abfiltrirt, die Mutterlauge von Neuem im Wasserbad erhitzt, bei beginnender Krystallabscheidung abermals filtrirt, auf derselben Nutsche abgesaugt etc. und dieses so oft wiederholt, als erneutes Erhitzen weitere Niederschlagbildung bewirkt. Die gesammelte Hydrazinverbindung wird dann gründlich mit heissem Wasser und absolutem Alkohol gewaschen. Dabei nimmt sie eine leuchtend hellgelbe Farbe an und ist meistens ohne Weiteres zur optischen Untersuchung geeignet; enthält sie dunkle Partikelchen, so kann sie durch Auskochen mit absolutem Alkohol, Lösen in Pyridin und Ausfällen mit Ligroin leicht gereinigt werden.

B. Mentholglucuronsäurehaltiger Harn.

Nach Verabreichung von 10 g Menthol an zwei Personen wurden 4 Liter Harn erhalten, welcher schwache Linksdrehung zeigte, eine deutliche Phloroglucin, aber keine Orcinprobe gab und Fehling'sche Lösung nicht erheblich reducirte. Der Harn wurde auf freiem Feuer auf ca. 200 ccm. eingengt und gemäss der beim Chloralhydratharn gemachten Erfahrungen mit nur¹⁾ 500 ccm. käuflichem Bleiessig versetzt. Der erhaltene voluminöse Niederschlag wurde nach gehörigem Auswaschen in ca. 750 ccm. Wasser suspendirt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das vom entstandenen Schwefelblei getrennte Filtrat färbte sich nun bei der zur Entfernung des gelösten Schwefelwasserstoffs vorgenommenen Einengung stark dunkel und zeigte jetzt einen stark positiven Ausfall der Orcinreaction und der Reductionsprobe mit Fehling'scher Lösung. Gleichzeitig trat unverkennbar der stechende Geruch des freien Menthols auf. Dieses Verhalten zwang zu der Annahme, dass die Flüssigkeit freie Glucuronsäure enthalte, also bereits eine Spaltung der Mentholglucuronsäure stattgefunden haben müsse.

In der That steht diese Erscheinung vollkommen im Einklang mit der von dem einen von uns²⁾ nachgewiesenen leichten Spaltbarkeit der Mentholglucuronsäure, die sogar schon bei längerem Stehen eine theilweise Zersetzung erfährt.³⁾

Zur Vervollständigung der Spaltung wurde nun die 400 ccm. betragende Flüssigkeitsmenge mit 4 ccm. concentrirter

1) Auch hier liessen sich in dem Niederschlag, den erneuter Bleiessigzusatz im Filtrat der ersten Bleifällung bewirkte, keine gepaarten Glucuronsäuren mehr nachweisen.

2) P. Mayer, Berl. klin. Wochenschrift, 1900, Nr. 1.

3) Die ausserordentliche Leichtigkeit, mit der diese Spaltung hier eintrat, macht es wahrscheinlich, dass sie durch die Gegenwart freier starker Säuren begünstigt gewesen sei. Die Titration einer Probe zeigte denn auch, dass der Gehalt an freier Säure erheblich die Menge überstieg, welche an freier Mentholglucuronsäure selbst bei quantitativem Uebergang des verabreichten Menthols in diese Verbindung hätte entstehen können. Die Anwesenheit dieser Mengen von freien, spaltend wirkenden Säuren findet nun sehr einfach dadurch ihre Erklärung, dass aus dem eingengten Harn ausser der Mentholglucuronsäure natürlich eine Anzahl anorganischer Salze durch Bleiessig niedergeschlagen wird,

Schwefelsäure im Autoclaven behandelt. Nach dieser Operation zeigte die Flüssigkeit eine Rechtsdrehung von 0,15 g und reducirte Fehling'sche Lösung schon bei gelinder Wärme; nach genauer Neutralisation wurde sie in der beschriebenen Weise mit 10 g p-Bromphenylhydrazinacetat behandelt und lieferte hierbei ca. 1 g reiner Hydrazinverbindung, die durch Bestimmung ihres Schmelzpunktes und ihrer optischen Drehung als die gesuchte identificirt wurde.

C. Thymolglucuronsäurehaltiger Harn.

Nach Eingabe von 4 g Thymol entleerter Harn zeigte eine Linksdrehung von 0,2%, auf Traubenzucker berechnet, reducirte Fehling'sche Lösung nicht, gab eine positive Phloroglucinprobe, aber keine Orcinreaction. Die 1200 ccm. betragende Harnmenge wurde mit Bleiessig versetzt und der entstandene Bleiniederschlag in der früher beschriebenen Weise behandelt. Die nach der Einwirkung von Schwefelwasserstoff resultirende Lösung von 200 ccm., welche eine Linksdrehung von 0,7% zeigte, wurde mit 2 ccm. concentrirter Schwefelsäure in der als Autoclav dienenden Steingutflasche unter den oben geschilderten Vorsichtsmassregeln erhitzt. Die nach der Spaltung erhaltene Lösung zeigte alle der freien Glucuronsäure zukommenden Reactionen und eine Rechtsdrehung von 0,2% Traubenzucker, entsprechend einem Gehalt von ca. 1,1 g Glucuronsäure. Auch hier gelang es, mit dem p-Bromphenylhydrazin eine Verbindung darzustellen, die sich durch die Bestimmung ihrer optischen Drehung als Glucuronsäurederivat erwies.

Nachdem uns nach diesem Verfahren der Nachweis dreier verschiedener gepaarter Glucuronsäuren ohne besondere Schwierigkeiten gelungen war, lag es nahe, im normalen Harn nach Glucuronsäureverbindungen zu suchen, da derselbe Eigenschaften besitzt, welche das Vorhandensein gepaarter Glucuronsäuren in ihm vermuthen lassen.

so besonders Chloride, Sulfate und Phosphate, die ebenso wie stets mitniedergerissenes Bleisubacetat nach Entfernung ihrer Basis durch Schwefelwasserstoff ihre freigemachte Säure zusammen mit der freien Mentholglucuronsäure in das Filtrat vom Bleisulfid liefern.

D. Normaler Harn.

Schon im Jahre 1876 hat Haas¹⁾ festgestellt, dass fast jeder normale Harn die Ebene des polarisirten Lichtes nach links dreht, welche Beobachtung später von Johannowsky, Galippe, E. Külz²⁾ und Anderen bestätigt wurde, welche die linksdrehende Substanz des normalen Harns näher untersucht haben. Haas macht von derselben folgende Angaben: «Durch Concentration reichert sich der Harn an der fraglichen Verbindung an; sie dreht in neutraler, saurer und alkalischer Lösung die Ebene des polarisirten Lichtes nach links, büsst diese Fähigkeit aber in stark alkalkalischer Lösung, wie sie Natriumcarbonat und Ammoniak erzeugen, ein, erlangt sie jedoch nach Ansäuerung wieder. Die nicht flüchtige Substanz wird dem eingedickten Harn durch Alkohol entzogen, von Thierkohle zum Theil zurückgehalten, weder von Bleizucker noch Bleiessig, dagegen von Bleiessig und Ammoniak gefällt. Zersetzt man den in Wasser suspendirten Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff, so enthält das wässrige Filtrat nicht die drehende Substanz, doch lässt sich diese dem Niederschlag von Schwefelblei durch heisses Wasser oder besser durch Alkohol entziehen, ist nun aber rechtsdrehend und reducirt alkalische Kupferlösung auch in der Wärme nicht.»

Vorzugsweise auf Grund dieser Angaben, denen Külz noch einige hinzufügte, ist von verschiedenen Seiten die Vermuthung ausgesprochen worden, dass der normale Harn Glucuronsäureverbindungen enthalte. Doch lassen sich gerade die von Haas gemachten Angaben über die fragliche linksdrehende Substanz mit unseren heutigen Kenntnissen über gepaarte Glucuronsäuren nicht in Einklang bringen. Denn sie zwingen entweder zu der Annahme, dass es rechtsdrehende gepaarte Glucuronsäuren gibt — bis jetzt sind jedoch nur linksdrehende bekannt — oder zu der Ansicht, dass bei seiner Versuchsanordnung eine mehr oder minder vollkommene

1) Haas, Centralbl. f. d. medic. Wissensch. 1876. 149.

2) Külz, Zeitschr. f. Biologie, 20, 166; 23, 338.

Galippe, Gazette med. de Paris, 1880, 259.

Johannowsky, Archiv f. Gynäkologie, 12, 1887.

Spaltung der Harnglucuronsäure in den betreffenden Alkohol und freie rechtsdrehende Glucuronsäure erfolgt ist; dann aber ist die Schwerlöslichkeit in Wasser und das Ausbleiben der sonst schon bei gelinder Wärme eintretenden Reduction alkalischer Kupferlösung unverständlich.

Wir haben denn auch im Verlauf unserer Untersuchung die Angaben von Haas gerade in diesen wesentlichen Punkten nicht bestätigen können und neigen der Meinung Huppert's¹⁾ zu, welche dieser über ähnliche Beobachtungen von Külz²⁾ an Harn von Pflanzenfressern äussert, dass es sich vielleicht um ein Gemisch verschiedener Substanzen, etwa Eiweisskörper, gehandelt haben möge.

Besonders eingehend hat Flückiger³⁾ die Frage, ob im normalen Harn Glucuronsäure vorkommt, erörtert und spricht sich dahin aus, dass jeder Harn Glucuronsäure enthält, der ein gewisser Antheil an der Reduction des normalen Harnes zukommt. Einen einwandsfreien Beweis für seine Anschauung konnte er natürlich bei den damaligen mangelhaften Methoden für den Nachweis der Glucuronsäure nicht erbringen. Der eine von uns⁴⁾ hat nun in seiner ersten Arbeit über die Glucuronsäure Untersuchungen mitgetheilt, welche die Anschauung von Flückiger wesentlich zu stützen geeignet sind. Da es ihm gelang, in einer Reihe von normalen Harnen, welche eine Linksdrehung bis zu 0,2% zeigten, einen positiven Ausfall der Orcinprobe nach dem Erhitzen mit H_2SO_4 zu erzeugen, hielt er es für sehr wahrscheinlich, dass in jedem Harn geringe Mengen gepaarter Glucuronsäuren vorhanden sind.

Wir hofften nun, durch die Combination unserer Methoden der Säurespaltung und Darstellung der Bromphenylhydrazinverbindung diese Annahme zur Sicherheit erheben zu können. Denn da der Nachweis, dass die Glucuronsäure ein normaler Harnbestandtheil ist, nur durch die Darstellung der Glucuronsäure selbst oder einer charakteristischen Glucuronsäure-

1) Huppert, Analyse des Harns, 1898, S. 202.

2) Külz, a. a. O.

3) Flückiger, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 9 (1885).

4) P. Mayer, Berl. klin. Wochenschr., 27 u. 28, 1899.

verbindung geführt werden kann, musste es uns gelingen, wenn der Harn wirklich Glucuronsäure enthält, die Bromphenylhydrazinverbindung derselben darzustellen.

Gleichzeitig lag es in unserem Plan, über die Natur der betreffenden Glucuronsäureverbindungen einiges zu eruiren, indem wir naturgemäss auf diejenigen Glucuronsäureverbindungen, welche man zunächst im normalen Harn vermuthen musste — Phenyl-, Indoxyl-, Skatoxyl-Glucuronsäure — unser Augenmerk richteten.

Nachdem wir zunächst einen Versuch mit 5 Liter Harn ohne Erfolg angestellt hatten, nahmen wir 50 Liter normalen Harnes in Angriff und verfahren bei seiner Verarbeitung ähnlich, wie wir es bei Harnen nach Choralhydrat-, Menthol- und Thymolgenuss mit Erfolg gethan. Der Harn wurde in Portionen von je 5 Liter in emaillirten Eisenschalen Anfangs auf freiem Feuer, zuletzt auf dem Wasserbad bis zu einem kleinen Volumen eingedampft, wobei das zur Conservirung zugefügte Chloroform entwich. Alle vereinten Rückstände wurden dann gemeinschaftlich auf dem Wasserbad bis auf etwa 2 Liter eingeengt. Ohne sie von den massenhaft auskrystallisirten Salzen zu trennen, wurden sie auf 3 grosse Schütteltrichter vertheilt, mit Schwefelsäure bis zur starksauren Reaction versetzt und mit je einem Liter eines Alkoholäthergemisches im Verhältniss 1:3 ausgeschüttelt. Die Alkoholätherauszüge wurden dann in Portionen von ca. $\frac{1}{2}$ Liter auf dem siedenden Wasserbad abdestillirt, das aufgefangene Alkoholäthergemisch unter Ersatz des verdunsteten zu neuen Ausschüttelungen verwandt, und diese mit jedem der drei Schütteltrichter 8 bis 10 Mal wiederholt, bis die Auszüge nur noch schwach gelbe Farbe besaßen. Die Rückstände aller Auszüge wurden in einem Kolben gesammelt und durch nochmaliges Erwärmen auf dem Wasserbad von anhaftenden Alkohol- und Aetherresten befreit; der nunmehr wässrige Rückstand wurde dann ohne Rücksicht auf sich ausscheidende Substanzen zu $1\frac{1}{2}$ Liter verdünnt und der systematischen Bleibehandlung unterworfen, d. h. erst mit Bleizucker ausgefällt (Niederschlag I), dann mit Bleiessig (Niederschlag II) und zum Schluss mit Bleiessig und Ammoniak (Niederschlag III). Alle 3 Niederschläge wurden

dann in je 1 Liter H_2O suspendirt und mit H_2S zersetzt. Das vom Schwefelblei getrennte Filtrat der Bleizuckerfällung (Niederschlag I) zeigte weder Drehung noch Reaction mit Phloroglucin oder Orcin, auch keine Reduction gegen Fehling'sche Lösung, und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Dagegen zeigte das vom Bleisulfid getrennte und durch Einengen auf ca. 300 ccm. vom Schwefelwasserstoff befreite Filtrat der Bleiessigfällung (Niederschlag II) ein ganz anderes Verhalten. Die Reductionsprobe mit Fehling'scher Lösung war negativ, der Ausfall der Phloroglucinprobe und der Orcinreaction positiv. Vor Allem aber zeigte die Lösung eine deutliche Linksdrehung entsprechend einem Gehalt von 0,8% Traubenzucker. Dieselbe wurde nun nach Zusatz von 3 ccm. concentrirter Schwefelsäure in der als Autoclav dienenden Steingutflasche eine Stunde lang auf der Temperatur des siedenden Wassers gehalten; nach völligem Erkalten wurde der Inhalt ausgegossen und nachgespült. Die schwach gelb gefärbte Flüssigkeit, deren Menge jetzt ca. 360 ccm. betrug, zeigte nun eine Rechtsdrehung von 0,2%, auf Traubenzucker berechnet, entsprechend einem ungefähren Gehalt von insgesamt ca. 1,9 g freier Glucuronsäure. Eine mit Natronhydrat alkalisch gemachte Probe reducirte Fehling'sche Lösung stark bei gelinder Wärme und zeigte alle übrigen Reductionerscheinungen der Glucuronsäure gegen alkalische Wismuth- und Quecksilberlösung, reducirte auch ammoniakalische Silberlösung unter Spiegelbildung; Orcin- und Phloroglucinreaction waren ausserordentlich stark. 250 ccm. wurden dann zur Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung mit 8 g p-Bromphenylhydrazinacetat behandelt und lieferten unter Einhaltung der früher beschriebenen Vorsichtsmassregeln etwa 1,1 g Hydrazinverbindung vom Schmelzpunkt 202° , die durch Drehungsbestimmung und Stickstoffanalyse als Glucuronsäureverbindung bestätigt wurde.

I. 0,2 g drehten im Decimeterrohr im Pyridinalkoholgemisch $-7^\circ 10'$.

II. Angewandte Substanz: 0,1770 g.

Erhalten: N = 11,4 ccm. bei 14° und 756 mm.

Gefunden: N = 7,51 %; berechnet für $C_{14}H_{17}O_7N_3$ Br : N = 7,35 %.

30 ccm. noch restirender, im Autoclaven gespaltener

Flüssigkeit wurden zur Bestimmung des Glucuronsäurepaarlings verwendet. Von den 3 zunächst in Betracht kommenden gepaarten Glucuronsäuren, Phenolglucuronsäure, Indoxylglucuronsäure und Skatoxylglucuronsäure, kommt den beiden letzteren wahrscheinlich eine Reductionsfähigkeit zu, da zu Folge der Versuche von Hoppe-Seyler und Mester¹⁾ der Harn nach Zufuhr von Indol und Skatol stärker reducirt, während die Phenolglucuronsäure, wie Külz²⁾ festgestellt hat, keine reducirenden Eigenschaften hat. Nachdem nun unsere Lösung vor der Spaltung alkalische Kupferlösung nicht reducirt hatte, war es von vornherein wahrscheinlich, dass es sich um Phenolglucuronsäure handeln würde. Um dies zu entscheiden, wurde die Flüssigkeit aus einem kleinen Siedekolben der Destillation unterworfen. Das farblose Destillat zeigte nun in der That starke Phenolreaction;³⁾ es gab mit Bromwasser einen dichten Niederschlag und färbte sich mit Bromkalk und Ammoniak lebhaft blaugrün. Dagegen liess sich weder Indoxyl noch Skatoxyl nachweisen. Durch diesen Befund war also das Vorhandensein von Phenolglucuronsäure im normalen Harn mit Sicherheit bewiesen.

Der gleichen Procedur wurde nun die letzte der Bleifällungen, der Bleiessigammoniakniederschlag, unterworfen. Das nach Trennung von Schwefelblei zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs auf 255 ccm. eingengte Filtrat zeigte eine Linksdrehung von 0,15°, gab eine schwache Phloroglucin- und Orcinreaction und reducirte Fehling'sche Lösung in geringem Grade. Nach Zusatz von 2,5 ccm. concentrirter H_2SO_4 wurde die Flüssigkeit alsdann eine Stunde lang in der Druckflasche auf 100° erhalten. Nach dem Erkalten war die Linksdrehung verschwunden, und die Flüssigkeit zeigte jetzt starke Orcin- und Phloroglucinreaction, sowie deutliche Reductionswirkung gegen Fehling'sche Lösung. Nach nochmaligem Erhitzen im Autoclaven auf 100° während einer Stunde

1) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VII, 1882/1883; Mester, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XII, 1888.

2) E. Külz, Pflüger's Archiv, 30, 485.

3) Phenol als Sammelbegriff für Phenol und Kresol.

zeigte die zuvor inactive Flüssigkeit eine minimale Rechtsdrehung; doch wurde wegen ihrer Kleinheit vom Darstellungsversuch der Bromphenylhydrazinverbindung von vornherein Abstand genommen. Die Anwesenheit einer gepaarten Glucuronsäure im ursprünglichen Bleiessigammoniak-Niederschlag war nach erfolgter Spaltung durch den positiven Ausfall aller Reactionen der freien Glucuronsäure ausser Zweifel gesetzt, umso mehr, da wir in der gespaltenen Flüssigkeit nun ohne Schwierigkeit die alkoholische Componente erkennen konnten. Bei der Jafféschen und der Obermayer'schen Indikanprobe zeigte nämlich unsere Flüssigkeit eine ausgesprochene Blau- bis Violettfärbung, so dass es wohl zweifellos ist, dass die in den Bleiessigammoniak-Niederschlag übergehende linksdrehende Substanz des normalen Harns Indoxylglucuronsäure, bezw. Skatoxylglucuronsäure ist. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden lässt sich aber durch die gewöhnlichen Proben nicht herbeiführen.

Was schliesslich die Quantität der im normalen Harn vorkommenden Glucuronsäure anlangt, so kann hier, wenn auch nur in ganz approximativer Weise, aus der Grösse der Rechtsdrehung nach erfolgter Spaltung auf die Menge der vorhandenen Glucuronsäure geschlossen werden, da die im normalen Harn in Betracht kommenden Paarlinge, Phenol, Indoxyl, Skatoxyl, keine optische Activität besitzen.

Der Gehalt der aus der Bleiessigfällung (Phenolglucuronsäure) nach Spaltung erhaltenen Lösung an Glucuronsäure betrug ca. 1,9 g. Rechnet man hierzu die geringe Menge Glucuronsäure, die aus der Bleiessig-NH₃-Fällung erhältlich ist, so kann rund ihre Gesamtmenge zu 2 g angenommen werden. In 50 Liter = 50 000 ccm. sind also ca. 2 g, in 100 ccm. demnach 0,004 g Glucuronsäure. Diese Zahl bleibt selbstverständlich hinter dem wahren Werth zurück, da einmal im Verlauf der mannigfachen Operationen kleine Verluste unvermeidlich sind, hauptsächlich aber, weil man bei der Spaltung der betreffenden Glucuronsäuren es nicht in der Hand hat, die gesammte Glucuronsäure zu erhalten.¹⁾

¹⁾ Es ist sehr schwer, ein Optimum in der spaltenden Wirkung der Schwefelsäure zu erzielen, da die Glucuronsäure in dem Maass, wie sie gebildet, durch die Säure zum Theil wieder zersetzt wird.

Es liegt nun in der Litteratur eine Angabe über den muthmasslichen Gehalt des Harns an Glucuronsäureverbindungen vor. G. de Chalmot¹⁾ gewann bei der Destillation des Abdampfrückstandes von 200 ccm. normalen Harns mit HCl ca. 0,025 g Furfurol. Unter der Annahme, dass allein Glucuronsäureverbindungen die furfurolgebenden Substanzen gewesen, würde diese Menge nach de Chalmot etwa 0,02 g Glucuronsäure in 100 ccm. Harn entsprechen. Später zeigten aber Mann und Tollens,²⁾ dass de Chalmot die Menge des aus Glucuronsäure abspaltbaren Furfurols fast 3mal zu gross angenommen (46,0% gegen 17,27%). Unter Berücksichtigung dieser Thatsache reducirt sich der Werth von Chalmot auf ca. 0,007 g, der angesichts der erwähnten Fehlerquellen mit unserer Zahl in angenäherter Uebereinstimmung steht, zumal bei de Chalmot's Bestimmung noch andere Harnbestandtheile — stets vorhandene Zuckerspuren, thierisches Gummi etc. — als furfurolbildend in Betracht kommen.

Wenn wir die Resultate unserer Untersuchung zusammenfassen, so können wir sagen:

I. Durch die Spaltung mit Säure und die Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung lässt sich der Nachweis von Glucuronsäure im Harn in einwandsfreier Weise erbringen. Allerdings ist die Darstellung der p-Bromphenylhydrazinverbindung nur möglich, wenn der Harn erheblichere Mengen gepaarter Glucuronsäuren enthält. Für den gewöhnlichen klinischen Nachweis wird meistens die einfache Säurespaltung mit dem positiven Ausfall der Orcinprobe genügen.

II. Durch vorliegende Untersuchung ist zum ersten Male der Beweis erbracht worden, dass die Glucuronsäure in gepaarter Form ein normaler Harnbestandtheil ist, und zwar ist sie in demselben — insoweit die Frage nach der Natur der Paarlinge im Rahmen der vorstehenden Versuche ihre Erledigung gefunden hat — grösstentheils an Phenol, zum kleineren Theil an Indoxyl, bezw. Skatoxyl gebunden.

1) G. de Chalmot, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 25, 2571.

2) Mann und Tolleus, Ann. d. Chem., 290, 156.

Ueber Löslichkeitsverhältnisse von Osazonen.

Von
Carl Neuberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1900.)

In letzter Zeit sind nicht nur im Harn, sondern auch in den verschiedensten Organen des Thierkörpers neue Kohlehydrate gefunden und zum Theil in Form ihrer Osazone isolirt. Das Arbeiten mit diesen Zuckern oder ihnen nahestehenden Derivaten wird, abgesehen von ihrer Empfindlichkeit, vielfach noch durch den Umstand erschwert, dass die Ausbeuten an Hyadrazinverbindungen häufig auffallend klein sind, und manche mühevollen Untersuchung auf diesem Gebiet erfährt durch Materialmangel einen unerwünschten Abschluss.

Eine Untersuchung über den Grund dieser geringen Er giebigkeit schien daher um so wünschenswerther, da man hoffen durfte, nach Erkennung desselben die Ausbeuten bessern zu können.

Die Ursache der erwähnten Erscheinung glaubte ich nun in der Veränderung der Löslichkeitsverhältnisse suchen zu müssen, welche die unter normalen Bedingungen schwer löslichen Osazone in dem complicirten Substanzgemisch der dem Organismus entstammenden Flüssigkeiten erfahren. Die Richtigkeit dieser Annahme liess sich in der That zunächst am Harn experimentell erweisen.

Wir verdanken nämlich Maquenne¹⁾ Angaben über die Osazonmengen, welche die verschiedenen Zuckerarten unter strenger Einhaltung ganz bestimmter Bedingungen liefern. Erwärmt man die Lösung von 1 g Kohlehydrat in 100 ccm.

¹⁾ A. Maquenne, Comptes rendus 112, 799.

Wasser mit 5 ccm. einer Phenylhydrazinacetatlösung, die 40 g Hydrazinbase und 40 g Eiessig in 100 ccm. Wasser enthält, eine Stunde im siedenden Wasserbad, sammelt den entstandenen Niederschlag auf einem gewogenen Filter oder Gooche-Tiegel, wäscht ihn mit 100 ccm. Wasser aus und trocknet bei 100°, so liefern die verschiedenen Zucker constante, von einander erheblich abweichende Osazonmengen, die von der Löslichkeit und Bildungsdauer des betreffenden Osazons abhängen.

Man findet so:

für Maltose	0,11 g Osazon
» Lactobiose	0,11 „ „
» Rhamnose	0,15 „ „
» d-Galactose	0,23 „ „
» l-Arabinose	0,27 „ „
» d-Glucose	0,32 „ „
» l-Xylose	0,40 „ „
» d-Lävulose	0,72 „ „
» Sorbinose	0,82 „ „

Ersetzt man nun in der Maquenne'schen Versuchsanordnung unter Beibehaltung aller übrigen Factoren die 100 ccm. Lösungswasser für das Kohlehydrat durch eben so viel Harn, so findet man für die d-Glucose und d-Lävulose, die allein zur Prüfung verwandt wurden, eine nicht unerhebliche Verminderung der Osazonmenge.

Versuch I. 1 g Traubenzucker gelöst in 100 ccm. Harn. Specifisches Gewicht 1014 und Gehalt an Stickstoff¹⁾ = 0,82%. Man erhält 0,186 g Osazon, d. i. 58,1% der aus reiner wässriger Lösung erhältlichen Menge.

Versuch II. 1 g Fruchtzucker, gelöst in 100 ccm. vom selben Harn. Man gewinnt 0,432 g Osazon, d. i. 60,0% der Menge Maquenne's.

War die zuvor geäußerte Ansicht richtig, dass ein Gehalt der aus dem Organismus stammenden Flüssigkeiten an Bestandtheilen irgend welcher Art die Verminderung der Osazonausbeute zur Folge habe, so musste ein Harn, der an solchen Substanzen reicher als der zu den Versuchen I und II verwandte war, d. h. ein solcher von grösserer Dichte, noch

1) In diesen wie den folgenden Bestimmungen nach Kjeldahl ermittelt.

weniger Osazone liefern. Dass dem in der That so ist, zeigen der

Versuch III. 1 g Traubenzucker gelöst in 100 ccm. Harn vom specifischen Gewicht 1043 und Stickstoffgehalt = 2,14% gibt 0,138 g Osazon, d. i. 43,4% der unter den von Maquenne gewählten Bedingungen möglichen Menge:

und

Versuch IV. 1 g Fruchtzucker, gelöst in 100 ccm. von dem zu Versuch III verwandten Harn. Man erhält 0,348 g Osazon, d. i. 48,3% der Ausbeute Maquennes.

Dieses Ergebniss ist um so auffallender, da man a priori bei einer dichterem, in den beschriebenen Fällen an gelösten Substanzen reicherem Flüssigkeit eine grössere «aussalzende Wirkung» voraussetzen könnte.

Der hohe Gehalt des Urins an Ammoniakabkömmlingen wie auch das Ergebniss der zur Charakterisirung der angewandten Harnen vorgenommenen Stickstoffbestimmungen erweckten bei mir die Vermuthung, in einem Gehalt an osazonlösenden Stickstoffderivaten die Erklärung für die erwähnten Erscheinungen zu suchen. Die im Folgenden beschriebenen Versuche über die Wirkung etlicher Stickstoffabkömmlinge auf Osazone bestätigten diese Annahme.

Während wässrige Alkalilösungen in der Kälte ohne Wirkung auf Osazone sind, wie Will¹⁾ gezeigt hat, vermögen sie einige derselben nach Lintner²⁾ bei Siedehitze zu zersetzen, und zwar in dem Sinne, dass unter Sprengung der Kohlenstoffkette des Zuckers die beiden Kohlenstoffatome, welche mit dem Hydrazinrest verbunden sind, mit diesem verknüpft als Dihydrazon des Glyoxals oder Osazon des Glycoaldehyds

$$\begin{array}{l} \text{CH:N-NRR'} \\ | \\ \text{CH:N-NRR'} \end{array}$$

abgespalten werden.

Ammoniak, Amine Ammoniumderivate zeigen nun dieses Verhalten nicht, dagegen ist den genannten Verbindungen sämmtlich ein mehr oder minder erhebliches Lösungsvermögen für Osazone — und weiterhin auch für Hydrazone und Hydrazide

1) Will, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft XXIV, 402.

2) C. I. Lintner, Chem. Zeitschr. 20, 763.

— eigen. Dabei zeigt sich nun, dass kaum ein Unterschied in der Leichtigkeit besteht, mit der Phenyllosazone oder Substitutionsprodukte derselben, wie Brom-, Nitro-, Methylphenyl-, etc., von ein und demselben Ammoniakderivat aufgenommen werden. Auch die Anzahl der Kohlenstoffatome des Zuckers ist ohne wesentlichen Einfluss auf die Löslichkeit seiner Osazone in dem gleichen Lösungsmittel der genannten Art. So werden die Osazone der Hexosen und die der Disaccharide ohne erkennbaren Unterschied, die Pentosazone dagegen etwas leichter als die ersteren, analog ihrem bekannten Verhalten zu Wasser und Alkohol aufgenommen,¹⁾ die Osazone der niederen Zuckerarten — Glycerosazon und Glycolaldehydosazon — aber wieder etwas schwerer.

Eine erhebliche Verschiedenheit zeigen nun die Ammoniakderivate in ihrem Lösungsvermögen für Osazone untereinander. Wässriges Ammoniak und Hydrazinhydrat besitzen nur geringe Lösungsfähigkeit, doch steigt diese sofort bei der Substitution eines Wasserstoffatoms der Stickstoffbase durch organische Radikale, und dabei ist leicht eine Abhängigkeit von der Art und Anzahl der Substituenten bemerkbar.

In der aliphatischen Reihe wächst das Lösungsvermögen mit der Zahl der Substituenten, da Trimethylamin mehr Osazon aufzunehmen vermag als Dimethylamin, dieses wieder mehr als Monomethylamin; ebenso verhalten sich Aethylhydrazin und Hydrazinhydrat zu einander. In der aromatischen Reihe macht sich dieser Einfluss der Zahl der eingetretenen Radikale nicht geltend, wohl aber ist hier die Lösungsfähigkeit im Vergleich zur aliphatischen Reihe erheblich vergrößert.

So nehmen Anilin, Methylanilin und Dimethylanilin einerseits und Phenylhydrazin und Methylphenylhydrazin andererseits angenähert gleich grosse, nicht unbeträchtliche Mengen

¹⁾ Diese Löslichkeitsbestimmungen wurden so ausgeführt, dass augenscheinlich gleiche Substanzmengen in gleich grosse Reagensgläser gefüllt wurden und die erforderliche Quantität Lösungsmittel als Maassstab ihrer Löslichkeit diente. Diese wurde ziffernmässig nur für d-Phenylglucosazon in Pyridin ermittelt und ergab, dass sich etwa 0,25 g Osazon in kaltem und ungefähr 0,6 g in 1 g heissem Pyridin lösen.

Osazon auf. In beiden Reihen, der aliphatischen wie aromatischen, verhalten sich die Homologen so wie die niedrigsten Glieder, wenigstens kann man kaum einen Unterschied zwischen den Methyl- und Aethylaminen, zwischen Methyl- und Aethylanilinen, zwischen Anilin, Toluidinen und Xylidinen oder zwischen Phenylhydrazin, geschmolzenem Toluyldhydrazin und Diphenylhydrazin in ihrer Wirkung auf Osazone erkennen.

Auch die Derivate des fünfwerthigen Stickstoffs verhalten sich durchaus den genannten Verbindungen ähnlich. So besitzen die Salze — sowohl die mit anorganischem wie organischem Säurerest — der sämtlichen genannten Verbindungen ein wenn auch theilweise geringes Lösungsvermögen für Osazone, das auch den quaternären Ammoniumbasen und ihren Salzen zukommt.

Eine besonders grosse Aufnahmefähigkeit für Osazone besitzen die cyklischen Amine und ihre Derivate, wie am Piperidin, Pyrrol, Diaethylendiamin (Piperazin), Collidindicarbonsäureester, Chinolin und Pyridin festgestellt wurde. Ueber die werthvollen Eigenschaften gerade der letztgenannten Base in ihrem Verhalten zu Osazonen ist schon an anderer Stelle berichtet.¹⁾

Auch die Amidosäuren, wie Glycocoll, Alanin, Leucin, Tyrosin und die Hippursäure, nehmen Osazone in heisser wässriger Lösung auf und scheiden sie in der Kälte weder auf Zusatz von Alkali noch Säure wieder aus.

Gleichfalls nehmen Säureamide, wie Formamid und Acetamid, wasserfrei und in wässriger Lösung, erhebliche Mengen Osazon auf, das in der Kälte in meist gut ausgebildeten Krystallen wieder ausfällt.

Aehnlich verhalten sich Harnstofflösungen, doch geben diese das gelöste Osazon erst nach Zerstörung des Carbamids durch Alkalinitrit und Säure wieder ab.

Das Lösungsvermögen für Osazone ist jedoch keineswegs an die mehr oder weniger hervortretenden basischen Eigen-

¹⁾ C. Neuberg, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, XXXII, S. 3384—3388.

schaften der angewandten Solventien geknüpft, wie das Verhalten der Nitrile und Senföle beweist. Denn Acetonitril, Milchsäurenitril, Benzonitril, Benzylcyanid (Phenylelessigsäurenitril), Allylsenföl und Phenylsenföl nehmen sämmtlich nicht unerhebliche Mengen Osazon auf, das sich aus heiss gesättigter Lösung meist gut krystallisirt wieder abscheidet.

Ebenso wie die erwähnten Stickstoffderivate, die meist flüssig oder leicht in Wasser löslich sind, verhalten sich die alkoholischen Lösungen ihnen nahe stehender Verbindungen. So nehmen alkoholische Lösungen von Diphenylamin, Benzidin, α - und β -Naphtylamin, p-Bromphenylhydrazin etc. mehr Osazon auf, als ihrem Alkoholgehalt entspricht.

Die dargelegten Verhältnisse sind in der That geeignet, Aufschluss über das Verhalten von Phenylhydrazin zu Kohlehydratlösungen zu geben, die neben wenig Zucker viel Stickstoffderivate von gleicher oder ähnlicher Art, wie die genannten, enthalten. Der Gehalt des Harns an Harnstoff, Ammonsalzen und anderen Stickstoffverbindungen erklärt zwanglos die Ergebnisse der zu Anfang beschriebenen Versuche I bis IV und auch die oft gemachte Beobachtung, dass man aus diabetischem Harn stets erheblich weniger Glucosazon zu isoliren vermag, als dem durch Polarisation oder titrimetrisch ermitteltem Zuckergehalt entspricht und man aus reinen wässerigen Lösungen von gleicher Concentration gewinnen kann.

Ganz ebenso liegen die Verhältnisse bei Fällen von Pentosurie und bei Harnen, in die auf alimentärem oder künstlichem Wege ein osazonlieferndes Kohlenhydrat gelangt ist.

Den Herren F. Blumenthal und P. Mayer verdanke ich die Mittheilung, dass sie eine analoge Beobachtung bei ihren Versuchen über die Abspaltung einer Hexose aus Albumin¹⁾ machten. Diese Forscher arbeiteten unter Bedingungen, die neben der Loslösung der Kohlehydratgruppe aus dem Eiweissmolekül die Bildung reichlicher Mengen Amidosäure zur Folge hatten. Sie vermochten auch hier nur bedeutend weniger Osazon

1) F. Blumenthal und P. Mayer, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XXXII, 274—278.

zu isoliren, als der Ausfall der Titration erwarten liess, und unter Verhältnissen, wo zwar die Menge des abgespaltenen Zuckers, aber mit ihm auch die der Amidosäuren und verwandter Körper vergrössert wurde, wuchs die Schwierigkeit der Osazongewinnung mit der Zunahme der entstehenden Stickstoffkörper.

In allen diesen Fällen findet die unvollständige Abscheidung der Osazone in den vorerwähnten Löslichkeitsverhältnissen eine ausreichende Erklärung.

Die Erkenntniss, dass durch die Gegenwart sehr vieler Stickstoffderivate in Folge der diesen Körpern eigenen osazonlösenden Kraft die Ausbeute an Hydrazinverbindung beeinträchtigt wird, wies den Weg, wie man diese unliebsame Wirkung in einigen Fällen bis zu einem gewissen Grade vermindern kann.

Die Verschiedenartigkeit der in Betracht kommenden Stickstoffabkömmlinge verbietet naturgemäss die Anwendung eines durchweg brauchbaren Verfahrens und zwingt zu einer Entscheidung von Fall zu Fall.

Bei der Verarbeitung von Organauszügen oder Eiweisspaltungsprodukten, wo die störenden Substanzen vorwiegend von salzbildender Natur (Amidosäuren) sind, kann man versuchen, dieselben durch Fällung als Metallverbindungen mittelst Silber-, Blei-, Kupfer- oder Erdalkalisalzen aus der Lösung zu entfernen. Beim Harn gelingt es zuweilen, die Ausbeuten an Hydrazinverbindungen zu steigern, wenn man vor Beginn ihrer Darstellung das Carbamid vorsichtig durch Alkalinitrit und Essigsäure zerstört und dann die in der Flüssigkeit gelösten Gase durch kurzes Erwärmen austreibt.

In allen Fällen aber, wo die Menge des Kohlehydrats gering ist, empfiehlt es sich, sorgfältig einen unnötigen Ueberschuss an Hydrazin bei der Osazonbereitung zu vermeiden und die anzuwendende Menge thunlichst nach dem Ausfall der Polarisirung oder Titration zu bemessen, vor allem aber im Verlauf der Operation eine Zunahme von Stickstoffderivaten irgend welcher Art hintanzuhalten.

Ein Fall von Meningocele.

Von

Wl. Gulewitsch.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Der Redaction zugegangen am 26. Februar 1900.)

Durch die Untersuchungen von Mott und Halliburton¹⁾ ist die Thatsache festgestellt, dass die Cerebrospinalflüssigkeit bei der Paralysis progressiva Cholin enthält, während diese Base in der normalen Cerebrospinalflüssigkeit abwesend ist. Da dieser Befund für die Pathologie der erwähnten Krankheit von Wichtigkeit ist, wäre es wünschenswerth, dass der Kreis der Beobachtungen über das Vorkommen resp. über die Abwesenheit von Cholin in der Cerebrospinalflüssigkeit bei den verschiedenen Zuständen des Organismus möglichst erweitert sei. Einen Beitrag zur Casuistik des Vorkommens von Cholin in der Cerebrospinalflüssigkeit zu liefern, bin ich jetzt in der Lage durch die Güte des Herrn Prof. Dr. L. Orlow, der mir einen Theil der Flüssigkeit übergeben hat, welche in seiner Klinik bei einer Meningoceleexcision gesammelt wurde.

Der Kranke P., 19 Jahre alt, bei dem diese Operation ausgeführt wurde, ist ein typischer Degenerat, zeigt aber keine Symptome von Paralysis progressiva. Von der bei der Operation entleerten Flüssigkeit standen mir zur Verfügung 300 ccm. Die Flüssigkeit war strohgelb und hatte ein niedriges specifisches Gewicht (1008); die Reaction derselben war alkalisch; die

1) F. W. Mott and W. D. Halliburton, Philosoph. Transact., Ser. B, Vol. 191 (1899), pag. 218.

Flüssigkeit enthielt äusserst wenig, fast nur Spuren von Eiweissstoffen und reducirte ziemlich kräftig die Fehling'sche Lösung.¹⁾

Die Flüssigkeit wurde mit Bleizuckerlösung vorsichtig gefällt, das Filtrat entbleit, das neue Filtrat auf dem Wasserbade unter Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure eingedampft und der Rückstand mit kaltem Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wurde mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid versetzt, der Niederschlag nach 24 Stunden abfiltrirt, mit Alkohol ausgewaschen, getrocknet und mit wenig kaltem Wasser behandelt. Die wässrige Lösung hinterliess nach dem Verdunsten einen nur äusserst geringen Rückstand, in dem keine charakteristischen Krystalle von Cholinplatinchlorid zu bemerken waren. Der in kaltem Wasser ungelöst gebliebene Theil des Platinchloridniederschlags wurde in heissem Wasser gelöst; aus dieser Lösung schieden sich ausschliesslich die Krystalle von Ammoniumplatinchlorid aus. Endlich wurde auch das alkoholische Filtrat von Platinchloridniederschlag untersucht. Dieses wurde durch Schwefelwasserstoff zersetzt, filtrirt und eingedampft. Der mit Goldchloridlösung versetzte Rückstand gab keinen Niederschlag von einem schwer löslichen Golddoppelsalz (Cholingoldchlorid ist in kaltem Wasser schwer löslich).²⁾

Somit enthielt die von mir untersuchte Meningoceleflüssigkeit kein Cholin.

Charkow, den 19. Februar 1900.

¹⁾ Nach Halliburton (l. c.) ist die reducirende Substanz Brenzcatechin.

²⁾ Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 531.

Über Bildung von Basen aus Eiweiss.

Von

Prof. Dr. **Rudolf Cohn.**

(Labor. f. exper. Pharmacologie und med. Chemie, Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 2. März 1900.)

Im XXII. Bande der Zeitschr. f. physiol. Chemie, S. 153 bis 175 habe ich über eine quantitative Eiweisspaltung durch Salzsäure berichtet und dabei eines in geringen Mengen auftretenden Spaltungsproduktes Erwähnung gethan, das ich als ein Pyridinderivat glaubte ansprechen zu dürfen. Es handelte sich um einen in schönen Nadeln vom Schmelzpunkt 295° krystallisirenden, äusserst leicht und charakteristisch sublimirenden Körper, der in Wasser sehr schwer, in heissem Alkohol leicht löslich war, von conc. H_2SO_4 , besonders beim Erwärmen, mit Leichtigkeit gelöst wurde und aus der Lösung auf Wasserezusatz wieder unverändert ausfiel, eine Eigenschaft, die sich als sehr geeignet erwies, um ihn von fremden Beimengungen, vor Allem Leucin, zu trennen. Auch sonst war er sehr widerstandsfähig gegen starke Säuren und Alkalien. Bei der Zinkstaubdestillation lieferte er anscheinend etwas Pyridin und aus den Analysen berechnete ich als wahrscheinliche Formel $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$.

Kurz nach meiner Veröffentlichung erhielt ich von Herrn Prof. Ritthausen hierselbst und von Herrn Prof. Erlenmeyer in Aschaffenburg Zuschriften, in denen sie mich auf die grosse Ähnlichkeit meines Pyridinderivates mit der sog. Bopp'schen Substanz, dem späteren Leucinimid der Autoren, hinwiesen und

eine Durchsicht der Originallitteratur¹⁾ sowohl, wie auch ein im Ritthausen'schen Laboratorium von mir vorgenommener Vergleich meiner Substanz mit etwas sog. Leucinimids, das von viele Jahre zurückliegenden Eiweisspaltungsversuchen her noch aufbewahrt war, überzeugten mich, dass beide Körper wohl in der That als identisch anzusehen seien.

Nun habe ich zunächst bei der Untersuchung gar nicht auf den Gedanken kommen können, dass es sich bei dem Körper etwa um Leucinimid handelte, denn meine Analysen stimmten nur auf einen Körper mit 5 C-Atomen, ausserdem aber wird das Leucinimid als Spaltungsprodukt der Eiweisskörper in den gebräuchlichen Lehrbüchern entweder gar nicht erwähnt, oder nur höchst ungenau beschrieben, speciell ist nirgends, auch nicht einmal in den Originalarbeiten, ein Schmelzpunkt angegeben, nach dem ich mich hätte richten können.

Es war nun aber weiter die Frage, ist denn der von den früheren Autoren als Leucinimid bezeichnete Körper überhaupt Leucinimid? Selbst die neuste Veröffentlichung von Ritthausen²⁾ lässt dies noch im Unklaren. Ritthausen machte nochmals eine Analyse des von früher her in seinem Besitze befindlichen sog. Leucinimids. Dasselbe scheint von ihm nicht weiter gereinigt zu sein, speciell nicht durch conc. H_2SO_4 , wie durchaus erforderlich ist, wenigstens werden darüber keine Angaben gemacht. Die Analyse, die Ritthausen anführt, ergiebt für

¹⁾ Bopp, F., Einiges über Albumin, Casein und Fibrin. Annal. Bd. 69. S. 16.

Erlenmeyer und Schöffner, Krit. Zeitschr. f. Chem. 1859. 333.

Hesse, O. Beiträge zur Kenntniss der Fäulnisproducte von Bierhefe. Journ. f. pract. Chem. Bd. 70. S. 34.

Hesse, O und H. Limpricht, Notiz über das sogenannte Leucinsäurenitril. Annal. Bd. 116. S. 201.

Erlenmeyer, E., Ueber das sog. Leucinsäurenitril und die Aminosäuren der Glycolsäurereihe. Annal. Bd. 119. S. 17.

Hlasiwetz und Habermann, Ueber die Proteinstoffe. Erste Abhandlung. Annal. Bd. 159. S. 328.

Ritthausen, H., Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Bonn, 1872. S. 222.

²⁾ Berl. Ber. XXIX. 2109—2110.

die Formel des Leucinimids $C_6H_{11}NO$ über 1% C zu wenig, für N 0,6% zu viel. Am Schlusse seiner kurzen Mittheilung enthält sich Ritthausen leider eines jeden Urtheils über den fraglichen Gegenstand.

Bei dieser Sachlage erschien es mir daher geboten, in eine erneute Untersuchung über die Natur der fraglichen Substanz einzutreten, und will ich in Folgendem über die zu dem Zwecke angestellten Versuche berichten.

Zunächst ging ich an die Darstellung von wirklichem Leucinimid, um seine Eigenschaften mit denen des Pyridinderivates vergleichen zu können. Ein Leucinimid ist von Kohler¹⁾ aus synthetischem Leucin, der aus Valeraldehyd-Ammoniak, Blausäure und Salzsäure nach Limpricht gewonnenen α -Amidoisobutylessigsäure, durch Erhitzen im trocknen Salzsäurestrom auf 220–230° dargestellt worden. Da es sich aber hier nur darum handeln konnte, dass das von mir als Pyridinderivat angesprochene fragliche Leucinimid, wenn es solches sein sollte, sich höchstwahrscheinlich nur aus dem bei der Eiweisspaltung durch Salzsäure entstandenen Leucin gebildet haben konnte, so durfte ich zur Darstellung des Leucinimids nur solches Leucin und nicht irgend ein beliebiges synthetisches nehmen.

7 g reines Leucin. (dasselbe war durch Caseinspaltung mittelst HCl erhalten, vielfach umkrystallisirt, farblos, zur Entfernung etwaiger Spuren des Pyridinderivates noch 2 Mal mit Alkohol ausgekocht, schmolz bei 273° im zugeschmolzenen Röhrchen) werden nach den von Kohler für die Darstellung von Leucinimid aus synthetischem Leucin gemachten Angaben im Oelbad in einem trocknen Kolben unter Durchleiten eines langsamen Stromes trockner Salzsäure allmählich bis 220–230° erhitzt und bei der Temperatur gehalten, bis es vollständig geschmolzen war. Das Schmelzen begann bei 215° und ging ziemlich langsam von Statten unter Bräunung und Aufschäumen und reichlichem Uebergang von amyalkoholähnlich riechenden

1) Kohler, A., Ueber eine neue Verwandlung des Leucins. *Annal.* Bd. 134. S. 367.

Tröpfchen durch das Abzugsrohr. Nach dem Abkühlen wurde der strahlig-krystallinisch erstarrte Rückstand 2 Mal mit etwa 50 ccm. 96%igen Alkohols ausgekocht, worin sich noch nicht Alles gelöst hatte. Die hellbraun gefärbte Lösung roch stark nach Amylalkohol. Beim Abkühlen schied sich nichts aus, nach dem Verjagen des Alkohols blieb ein mit wenig Harz vermengter krystallinischer Rückstand, der aus Nadeln bestand (A). Der durch den kochenden Alkohol noch nicht gelöste Rückstand wurde mit etwa 100 ccm. Wasser längere Zeit ausgekocht, es löste sich darin nur ein Theil, beim Abkühlen schied sich aus der Lösung (B) bis zum nächsten Tage nichts aus. Der in Wasser unlösliche Rückstand löste sich jetzt leicht in wenig kochendem Alkohol, aus dem sich beim Abkühlen breite, verästelte Nadeln ausschieden, die abgesogen und mit wenig Alkohol ausgewaschen wurden. Sie sind schneeweiss, sublimiren ohne Rückstand in wolligen Flocken, schmelzen bei 260° .

Der Rückstand A wird mit einem Theil der wässerigen Lösung B ausgekocht, die ganze Lösung B auf 50 ccm. eingedampft. Es scheiden sich wenig amorphe Lamellen aus, die sich nach dem Umkrystallisiren aus Alkohol als identisch mit den eben erwähnten Nadeln erwiesen. Das wässrige Filtrat erstarrt nach dem Eindampfen zu einem Brei von spitzen Blättchen. Durch Behandlung mit Ag_2O wurden daraus $4\frac{1}{2}$ g Leucin zurückgewonnen.

Der aus Nadeln bestehende Alkoholrückstand A, welcher 1 g wog, wurde 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirt, das erste Mal unter Entfärbung mit etwas Thierkohle. Man erhält lange, stark gebogene, ährenförmig gruppirte, feine und breitere Nadeln, deren Schmelzpunkt, der sich nach dem Umkrystallisiren nicht mehr änderte, bei 262° lag. Sie sublimiren sehr leicht in wolligen Flocken, ähnlich dem Pyridinderivat. Von diesem unterscheiden sie sich durch den um 33° niedrigeren Schmelzpunkt, leichtere Löslichkeit in Alkohol, anscheinend noch schwerere in Wasser, leichtere Löslichkeit in Aether. Trocken zerrieben zeigt die Substanz electrische Eigenschaften.

N. Bestimmung.

0,1826 g (hatte bei 105° nicht abgenommen) gab 19,5 ccm. N bei 120 C. und 754 mm. Bar. $N = 0,02296320 = 12,57\%$.

Leucinimid, $C_6H_{11}NO$, verl. $N = 12,39\%$.

Es handelt sich hier also bestimmt um Leucinimid. Dasselbe zeigt aber durchaus andere Eigenschaften, als das Pyridinderivat, wenngleich eine gewisse Aehnlichkeit der beiden Körper nicht zu verkennen ist. Das Pyridinderivat ist also entweder kein Leucinimid, oder es ist noch mit irgend etwas verunreinigt resp. chemisch verbunden, eine Annahme, für die keine Veranlassung vorliegt, oder aber es ist ein Isomeres des aus Leucin künstlich dargestellten Leucinimids. In diesem Falle müsste man zwei isomere Leucine im Eiweissmolekül annehmen, von denen nur das eine, in geringeren Mengen vorhandene, schon bei der Eiweisspaltung durch Salzsäure in Leucinimid übergeht.

Der Rest des schon 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirten, zu obiger Analyse benutzten Leucinimids wurde in gleicher Weise, wie ich es beim Pyridinderivat gethan, in conc. H_2SO_4 gelöst, durch Wasserzusatz wieder ausgefällt, abfiltrirt, ausgewaschen, getrocknet und aus Alkohol umkrystallisirt. Es schieden sich gerade, lange, feine und breite Nadeln aus, die wiederum bei 262° schmolzen.

Um die Natur des Körpers C_6H_7NO als eines Pyridinderivates sicher zu stellen, wollte ich nochmals eine Reduction einer grösseren Menge durch Zinkstaub vornehmen. Zu dem Zwecke unterwarf ich 3 g der vollständig gereinigten Substanz der Zinkstaubdestillation im H-Strome. Dieselbe verunglückte indess, da sich das Rohr durch die dicken Sublimationswolken stets verstopfte und die gebildeten Dämpfe rückwärts in die zum Trocknen des H benutzte H_2SO_4 destillirten. Es war jedoch nach Unterbrechung der Destillation Pyridin oder ein ihm jedenfalls sehr nahe stehender Körper durch den Geruch im ganzen Zimmer deutlich nachweisbar. Durch Auskochen des Zinkstaubs mit Alkohol liess sich noch 0,8 g der Substanz zurückgewinnen, an der deutlich der Pyridingeruch haftete.

Da ich mir genügendes Material zu weiteren Reductions-

versuchen mittelst Zinkstaubdestillation nur sehr schwer hätte beschaffen können, denn die Ausbeute an reiner Substanz betrug nur 1—2 g für 1 Kilo Casein und erforderte die Arbeit von 1—2 Monaten, so versuchte ich jetzt durch eine Reduction auf nassem Wege mittelst metallischen Natriums in alkoholischer Lösung zum Ziele zu gelangen. Zu dem Zwecke löste ich 2 g des fast absolut reinen Pyridinderivates (dasselbe war ein Mal aus Alkohol, ein Mal aus conc. H_2SO_4 und dann nochmals aus Alkohol umkrystallisirt, fast schneeweiss) in 250 ccm. absoluten Alkohols in einem geräumigen Kolben mit aufgesetztem weiten Liebig-Kühler auf dem Wasserbade und warf in die klare kochende Lösung kleine Stückchen metallisches Na durch den Kühler hindurch, bis keine Einwirkung mehr stattfand. Nach Zufügung von so viel absolutem Alkohol, dass sich nach einigem Kochen alles Na löste, wurde mit der gleichen Menge Wasser verdünnt. Es fiel dabei nichts aus, während, wenn man in einer Probe noch etwas unverändertes Pyridinderivat auflöste, dieses auf Wasserzusatz sofort ausgefällt wurde. Es war also jedenfalls eine Veränderung des Pyridinderivates eingetreten. Am nächsten Tage wurde der gesammte Alkohol aus dem Wasserbade abdestillirt. Das Destillat reagierte nur äusserst schwach alkalisch, hinterliess nach dem Ansäuern mit HCl und Abdampfen zur Trockne nur einen minimalen, bräunlichen Rückstand, der einen intensiven tabakähnlichen Geruch zeigte. Zu einer Untersuchung reichte die Menge nicht aus.

Die das Reduktionsprodukt enthaltende, wässrige alkalische Lösung wurde nun 2 Mal mit Aether extrahirt. Eine kleine Probe des Aetherauszugs hinterliess, im Schälchen verdunstet, einen stark alkalischen Rückstand, dessen Geruch stark basisch, piperidinähnlich war. Daneben war aber auch deutlicher Geruch nach Acetamid vorhanden. Der Rückstand war nicht krystallinisch. Als zu dem mikroskopischen Präparat vom Rande her etwas HCl zugesetzt wurde, schossen nach einiger Zeit lange Nadeln in Rosettenform an. Der kleine Aetherrückstand wurde darauf mit Wasser verrührt, ein Theil auf dem Uhrglas mit einem Tropfen HCl und einem Tropfen $PtCl_4$ versetzt. Sofort schied sich ein krystallinisches Pt-Salz aus, mikroskopische

Blättchen. Pikrinsäure lieferte mit dem übrigen Rest nur eine amorphe Fällung.

Nach diesen Vorproben wurden die beiden vereinigten Aetherauszüge bis auf ca. 30 ccm. abdestillirt. Bis zum nächsten Tage haben sich geringe Mengen Krystalle, anscheinend unveränderte Substanz, abgeschieden, von denen abfiltrirt wurde. Hierauf wird der Aether fast ganz abdestillirt. Es bleibt ein hellbrauner Syrup von eigenartigem Geruch, stark alkalischer Reaction. Er wird in ein kleines Becherglas gegossen und die letzten Spuren Aether langsam an der Luft verdunsten gelassen.

Die letzten, im Destillationskölbchen haften gebliebenen Reste des Aetherrückstandes werden mit etwas Wasser übergossen, die trübe gewordene Flüssigkeit mit 2 Tropfen HCl versetzt, filtrirt, mit etwas Wasser nachgewaschen und das fast klare, saure Filtrat mit alkoholischem PtCl_4 versetzt. Es scheidet sich sofort ein Pt-Salz aus, mikroskopisch feine gezähnte Blättchen. Dieselben werden nach einigen Stunden abfiltrirt, mit Alkohol und Aether ausgewaschen. Das Salz ist so schwer in Alkohol und Wasser löslich, dass es sich nicht umkrystallisiren lässt.

0,1366 g (bei 105° getr., wobei es nur 0,0006 g verloren hatte) gaben 0,0441 g Pt = 32,3%. $(\text{C}_6\text{H}_4\text{N} \cdot \text{HCl})_2 \cdot \text{PtCl}_4$ verl. Pt = 32,2%.

Die Hauptmasse der Base, welche starke Nebel bildet, wenn man einen mit HCl befeuchteten Glasstab darüberhält, wurde nun mit Wasser übergossen, mit HCl bis zur bleibenden sauren Reaction versetzt, wobei eine geringe Menge harzig ungelöst blieb, und filtrirt. Von einem kleinen Theil des klaren Filtrats wurde nochmals ein Pt-Salz gemacht.

0,1545 g (bei 105° getr., war wasserfrei) gaben 0,0502 g Pt = 32,5%.

Der ganze Rest des Filtrats wurde auf dem Wasserbade etwas eingeeengt, nochmals filtrirt und weiter eingedampft, bis an der Oberfläche Krystallbildung begann. Verfärbung trat dabei nicht ein. Das salzsaure Salz schied sich, trotzdem bis auf ein sehr kleines Volumen eingedampft war, nur in geringen Mengen aus. Es war in Wasser leicht löslich. Es wurde nun mit seiner Mutterlauge in Alkohol im Ueberschuss durch Er-

wärmen klar gelöst, filtrirt und zur heissen Lösung Aether zugesetzt, ohne dass eine Trübung eintrat. Nach 6 Stunden hatten sich allmählich aus Nadeln bestehende, farblose Krystalldrusen abgeschieden. Sie werden am nächsten Tage abfiltrirt, mit einem Gemisch aus Alkohol und Aether, zuletzt mit reinem Aether ausgewaschen, wiegen 0,1 g. Das Filtrat wird darauf mit Aether bis zur bleibenden Trübung versetzt, worauf eine zweite Krystallisation eintrat, die aus mikroskopisch kleinen spitzen Nadeln bestand, im Ganzen 0,08 g. Durch weiteren Aetherzusatz zum Filtrat erhält man nur noch eine minimale Abscheidung. Die ersten beiden Fractionen verhalten sich gleich, schmelzen noch nicht bei 300° , sublimiren ähnlich wie Leucinimid. Sie werden beide vereinigt und davon eine N-Bestimmung nach Dumas gemacht, die indes wegen eines zu spät bemerkten Fehlers im Gasabsorptionsapparat missglückte, bevor noch die Substanz verbrannt wurde. Ihr Gemenge mit CuO wurde mit viel Wasser übergossen, am nächsten Tage abfiltrirt, etwas gelöstes Cu durch H_2S entfernt und das Filtrat auf 1–2 ccm. eingedampft. Der krystallinische Rückstand war jetzt auffallender Weise sowohl in heissem Wasser, wie in Alkohol sehr schwerlöslich, ein Theil ging gar nicht in Lösung; er bestand mikroskopisch aus radiär gruppirten Büscheln sehr langer, breiter Nadeln, die bei 300° noch nicht schmolzen. Die Substanz hatte sich in nicht aufzuklärender Weise verändert.

In einem zweiten Reduktionsversuche wurden 1,7 g des Pyridinderivates in gleicher Weise verarbeitet. Der Aetherrückstand wurde mit Wasser und einigen Tropfen HCl bis zur schwach sauren Reaction versetzt, von dem ungelösten Harz abfiltrirt, das Filtrat eingeeengt, nochmals filtrirt und auf 1 bis 2 ccm. eingedampft, dann in Alkohol durch Erwärmen gelöst, und die klare Lösung bis zur beginnenden bleibenden Trübung mit Aether versetzt. Es scheidet sich 0,135 g des salzsauren Salzes aus. Das Filtrat gibt mit Aether nur noch eine geringe Ausscheidung. Dieselbe wird zusammen mit der letzten des vorigen Versuches abfiltrirt, die vereinigten Filtrate auf etwa 2 ccm. abdestillirt und nochmals mit Aether gefällt. Die Ausscheidung wurde abfiltrirt, nochmals in Alkohol heiss gelöst

und mit Aether gefällt. Man erhält 0,1 g, die mit den 0,135 g vereinigt werden.

0,2142 g (bei 110° getr.) gaben $N = 19,9$ ccm., bei $t = 10,5^\circ$ und Bar. = 772 mm. $N = 0,02416258$ g = 11,3% $C_6H_{13}N.HCl$ verl. $N = 10,3\%$.

Ob das salzsaure Salz schon hinreichend rein gewesen war, hatte nicht mit Sicherheit festgestellt werden können.

Die nach der letzten Abscheidung des salzsauren Salzes erhaltene wässerig-alkoholisch-ätherische Mutterlauge wurde vollständig abdestillirt. Es blieb ein dicker, hellbraun gefärbter Syrup, der nach mehrtägigem Stehen nicht fest wurde. Er wurde in Wasser unter Zusatz von etwas HCl gelöst, filtrirt und die Lösung vollständig mit alkoholischem $PtCl_4$ ausgefällt. Es entstand ein reichlicher Niederschlag, kleine, unregelmässige Blättchen. Das Salz wurde abfiltrirt und mit Wasser ausgewaschen. Nach über 10 maligem Auswaschen enthielt das Waschwasser noch HCl und es schien sich ein Theil des Salzes zu lösen, weshalb das Auswaschen zunächst unterbrochen wurde. Es wurde darauf 2 Mal mit je 100 ccm. Wasser ausgekocht, die Filtrate, aus denen sich nichts ausschied, auf 10 ccm. eingedampft, lieferten nur eine geringe Menge Blättchen, die zur Analyse nicht ausreichten. Von einem Theil des ausgekochten Pt -Salzes wurde eine Pt -Bestimmung gemacht.

0,2144 g gaben 0,0695 $Pt = 32,4\%$. $(C_6H_{13}N.HCl)_2PtCl_4$ verl. $Pt = 32,2\%$.

Der Rest des Salzes — 0,43 g — wurde in kochendem Wasser gelöst, wozu $\frac{3}{4}$ l. erforderlich war. Beim Abkühlen schied sich aus der klaren, schwach gelblichen Lösung nichts aus. Beim Eindampfen zersetzte sie sich unter Schwarzfärbung.

Zur weiteren Durchführung des Vergleiches zwischen Pyridinderivat und Leucinimid stellte ich zunächst an einer geringen Menge des letzteren ebenfalls einen Reduktionsversuch an. 1,9 g reines Leucinimid (Schmelzpunkt 262°) werden in 200 ccm. absoluten Alkohols gelöst — die Lösung vollzog sich viel leichter als die des Pyridinderivats —, mit Na reducirt, darauf mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und der Alkohol abdestillirt, die alkalische Lösung mit Aether extrahirt, die Aetherauszüge abdestillirt, der letzte Aetherrest an der Luft

verdunsten gelassen. Es bleibt ein stark alkalischer, flüssiger Rückstand. 3 Tropfen davon werden in Wasser unter Zusatz von HCl bis zur schwach sauren Reaction gelöst, filtrirt, mit wässeriger PtCl_4 -Lösung versetzt. Auf Alkoholzusatz scheidet sich das Platinsalz aus.

0,0625 g (bei 110° getr.) gaben 0,0201 Pt = 32,2%.

$(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N.HCl})_2\text{PtCl}_4$ verl. Pt = 32,2%.

Um die Eigenschaften der Base besser studiren zu können, suchte ich sie nun durch Destillation zu reinigen. Bis 90° gingen nur einige Tropfen, der Hauptsache nach anhaftende Spuren Aether und Feuchtigkeit, über, dann stieg das Thermometer schnell auf 230° , und zwischen 240 und 245° ging die Hauptmasse über. Es ist eine klare, schwach gelbliche, dicke Flüssigkeit von stark alkalischer Reaction und eigenthümlichem basischen Geruch, die nach längerem Stehen einige Krystalle, mikroskopisch grosse Tafeln, absetzte. Aus der Base (10 Tropfen) wurde in derselben Weise, wie beim Pyridinderivat angegeben, das salzsaure Salz hergestellt, dasselbe zeigte die gleichen Eigenschaften. Zu einer Analyse war die Menge zu gering.

Von dem im Siedekölbchen verbliebenen minimalen Rest der Base wird noch ein Pt-Salz gemacht.

0,1296 g (bei 110° getr.) gaben 0,0415 g Pt = 32,0%.

Um die aus dem Pyridinderivat durch Reduction zu gewinnende Base in grösseren Mengen zu erhalten und dann durch Destillation zu einem reinen Produkt zu gelangen, das ich bisher immer noch nicht in Händen gehabt, unterwarf ich jetzt 4,8 g desselben (es war aus conc. H_2SO_4 und dann einmal aus Alkohol umkrystallisirt, noch etwas grau gefärbt) der Reduction. Zur Lösung waren 800 ccm. kochenden absoluten Alkohols erforderlich, zum Schluss wurden, um die letzten Reste des zugesetzten Na zu lösen, noch 50 ccm. absoluten Alkohols zugefügt. Hierauf wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt, am nächsten Tage der Alkohol abdestillirt und die schwach bräunliche Lösung 3 Mal mit Aether extrahirt. Die Aetherauszüge riechen sehr stark nach Acetamid, was beim Leucinimid nicht beobachtet wurde. Der Aether wurde

nach dem Klären und Filtriren abdestillirt, der letzte Rest im Becherglas an der Luft verdunsten gelassen. Der Rückstand, in dem sich noch geringe Mengen unveränderter Substanz abgeschieden hatten, wog am nächsten Tage 2,2 g. Er wird aus einem ganz kleinen Siedekölbchen abdestillirt. Nachdem der erste Antheil unter 100° übergegangen, stieg das Thermometer schnell über 235° , und die Hauptmasse ging bei 245 bis 250° über. Sie bildet eine schwach gelblich gefärbte, dicke Flüssigkeit von stark basischem Geruch, ähnlich demjenigen der Leucinimidbase, von der die Substanz auch in ihren sonstigen Eigenschaften nicht zu unterscheiden war.

Da die Ausbeute an der Base aus dem Pyridinderivat keine quantitative war (kaum 50%), so suchte ich eventuell vorhandene Nebenprodukte zu gewinnen. Die nach dem dreimaligen Ausschütteln mit Aether zurückbleibende wässrige, stark alkalische Flüssigkeit wurde mit HCl unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses angesäuert. Nach dem Abkühlen und Stehen über Nacht schieden sich auf der Oberfläche schwimmende, kleine, farblose Krystallwärcchen aus, die in Aether löslich sind. Sie bildeten unterm Mikroskop Aggregate von gezähnten Blättchen. Die ganze, schwach nach Buttersäure riechende Flüssigkeit, an deren Boden sich noch eine dunkelbraune, amorphe Masse abgeschieden, die nicht in Aether löslich ist, wird 3 Mal mit Aether extrahirt, die Aetherauszüge abdestillirt, der letzte Rest im Becherglase an der Luft verdunsten gelassen, dann im Exsiccator getrocknet. In einem Vorversuch hatte ich mich an einer kleinen Probe des Aetherextractes überzeugt, dass sein Rückstand krystallisirte, sich in verdünnter Natronlauge leicht löste; aus der Lösung fiel beim Ansäuern mit HCl die Substanz in sehr kleinen, mikroskopischen Krystallen aus, die sich bei weiterem Zusatz von HCl wieder auflösten. Der gesammte Aetherrückstand wiegt nach mehrtägigem Stehen im Exsiccator 0,65 g. Er wird in verdünnter NaOH heiss gelöst, das gelbliche Filtrat vorsichtig mit verdünnter HCl versetzt, so lange noch etwas ausfiel. Die Krystalle bestanden unterm Mikroskop aus garbenförmigen Büscheln kleiner Nadeln, daneben zeigte sich noch eine staub-

förmige Trübung. Am nächsten Tage wurden die Krystalle von der noch trüben Mutterlauge, welche auf HCl-Zusatz nur noch eine minimale Ausscheidung gab, abfiltrirt und mehrmals mit kaltem Wasser ausgewaschen. Sie sind schwach gelblich gefärbt, lösen sich sehr schwer in kochendem Wasser, schmelzen trocken erhitzt zu öligen Tropfen, die bald wieder krystallinisch erstarren. Sie wiegen 0,2 g. Aus kochendem Wasser, von dem verhältnissmässig erhebliche Mengen zur Lösung erforderlich waren, scheiden sie sich in farblosen Blättchen aus, unter dem Mikroskop grosse, dünne, rechteckige, übereinandergeschobene Tafeln, die bei 128° schmelzen und N-haltig sind. Für eine Analyse war die Menge, 0,08 g, zu gering. Nach ihren Eigenschaften handelt es sich möglicher Weise um eine Amidosäure.

Nach Entfernung dieser Säure durch Ausschüttelung mit Aether wurde, um das immer noch bestehende Deficit gegen die angewandten 4,8 g des Pyridinderivates aufzudecken, die schwach salzsaure wässrige Lösung eingedampft — es ging dabei ein Theil verloren —, von den zunächst ausgeschiedenen grossen Kochsalzmengen abfiltrirt, mit Alkohol nachgewaschen, das Filtrat bis fast zur Trockne verdampft, der Rückstand mit 50 cm. Alkohol verrieben, von dem Kochsalz abfiltrirt, die alkoholische Lösung zur Trockne verdampft und durch häufig wiederholte Aufnahme mit kaltem absoluten Alkohol und Abdampfen zur Trockne fast die gesammte NaCl-Menge entfernt. Man erhielt zuletzt einen Rückstand, der sich in Wasser löste, mit PtCl_4 und mit Jodwismuthjodkalium Fällungen gab. Er enthielt noch etwas von der Base (0,05 g), nach deren Entfernung ein fast Cl-freier Rückstand gewonnen wurde, der einige dg wog und nicht zum Krystallisiren zu bringen war. Eine Entscheidung über die Natur desselben konnte nicht herbeigeführt werden.

Da mein Vorrath an dem Pyridinderivat zu Ende ging und die Darstellung desselben in grösseren Mengen mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft war, so beschränkte ich mich darauf, grössere Mengen der Base aus dem leichter zu beschaffenden Leucinimid darzustellen, um zunächst die Eigen-

schaften und Zusammensetzung derselben genau festzustellen. Zu dem Zwecke reducirte ich in einem ersten Versuche 7,1 g reines Leucinimid in 400 ccm. absoluten Alkohols in der gewöhnlichen Weise. Nach Abdestilliren des Alkohols wurde die wässerige alkalische Lösung 3 Mal mit Aether extrahirt, der Aetherrückstand wog exsiccator trocken 5,1 g. Er wurde nun nochmals in wenig Aether gelöst, von etwas ausgeschiedenem unveränderten Leucinimid abfiltrirt, das klare Filtrat im Siedekölbchen erst auf dem Wasserbade von Aether möglichst befreit, dann der fractionirten Destillation unterworfen. Nachdem bis 90° etwa 1 ccm. übergegangen war, stieg das Thermometer bis 225° und jetzt destillirte eine dicke Flüssigkeit über, während das Thermometer allmählich bis 298° stieg, ohne constant zu werden. Ein kleiner Rest blieb im Siedekölbchen zurück. Das gelbliche, dickflüssige Destillat wog 3 g. Die Base hat einen äusserst bitteren, brennenden, ätzenden Geschmack, der dem concentrirten KOH an die Seite zu stellen war. Sie wurde nach einigem Stehen zum Theil krystallinisch, bildete nach mehreren Tagen einen dicken Krystallbrei. Es wurde nun versucht, durch nochmalige Destillation zu einer Fraction von constantem Siedepunkt zu gelangen, indessen war dies nicht zu erreichen, das Meiste ging zwar bei 250 bis 260° über, aber das Thermometer stieg doch ganz allmählich bis 275°. Das gewonnene Destillat wog 2,2 g. Dasselbe war nach einigen Tagen von Krystallen erfüllt, dicke, breite Nadeln. Das Glas liess sich umkehren, ohne dass die Masse sich bewegte. Es wurde nun die ganze Menge in das salzsaure Salz übergeführt, ein Theil wurde durch Auskrystallisiren aus wässriger Lösung, das Uebrige durch Fällung mit Alkohol und Aether gewonnen. Ich erhielt jedoch nur 0,6 g, der grössere Rest blieb in der Mutterlauge gelöst, die beim Verdunsten einen allmählich krystallisirenden Rückstand hinterliess, aus dem nach nochmaligem Lösen in Alkohol und Fällen mit Aether nichts auskrystallisirte. Das salzsaure Salz schmolz noch nicht bei 300°.

In ähnlicher Weise wie bei dem Pyridinderivat gewann

ich auch hier neben der Base noch eine Säure von den Eigenschaften einer Amidosäure, die N-haltig, in Wasser sehr schwer löslich war; es schieden sich nach dem Umkrystallisiren aus kochendem Wasser feine, unregelmässige Tafeln und Blättchen ab, die bei 126° schmolzen. Ob beide Säuren identisch waren, konnte ich nicht entscheiden, zu einer Analyse war nicht genügendes Material vorhanden.

Bei einer erneuten Darstellung von Leucinimid erwies es sich, behufs Erzielung einer grösseren Ausbeute, die bisher immer noch sehr viel zu wünschen übrig liess, nach mehrfachem Ausprobiren am besten, das Leucin unter Durchleitung trockener HCl bis 235—240° im Oelbade zu erhitzen und etwa 15 Minuten bei dieser Temperatur zu lassen. Es ging von 220° ab etwas Wasser und geringe Mengen einer scharf riechenden, an Amylalkohol erinnernden Flüssigkeit über. Im Hals des Kolbens sammelte sich ein reichliches Sublimat an. Der Kolbeninhalt wurde nach dem Abkühlen mit mehreren Portionen Alkohol auf dem Wasserbade ausgekocht, es musste sehr anhaltend gekocht werden, um Alles in Lösung zu bringen. Bis zum nächsten Tage hatte sich aus den vereinigten Lösungen ein reichlicher Krystallbrei ausgeschieden, der schon aus fast reinem Leucinimid bestand. Dasselbe wurde abfiltrirt und mit Alkohol ausgewaschen. Das Filtrat lieferte nach dem Einengen noch eine zweite Abscheidung, deren Filtrat nur noch Schmierien lieferte, die zwar noch Leucinimid enthielten, dasselbe war aber nur schwer zu isoliren. Es wurden stets Portionen von 10—15 g Leucin gesondert verarbeitet, weil bei Anwendung grösserer Mengen Leucin auf einmal die Ausbeute erheblich verschlechtert zu werden schien. Aus 46 g Leucin erhielt ich ca. 15 g Leucinimid, die nach Entfernung von etwas beigemengtem salzsauren Leucin durch Auskochen mit Wasser 14 g reines Leucinimid lieferten. Weitere 90 g Leucin, in Portionen zu 15 g verarbeitet, ergaben 23 g Leucinimid. Die Gesamtausbeute betrug also noch nicht 30%. Sämmtliche alkoholischen letzten Mutterlaugen wurden vereinigt, zum Syrup eingedampft und zum Krystallisiren stehen

gelassen. Nach vielen Monaten hatte erst eine geringe Abscheidung von Krystallen stattgefunden, deren Isolirung vorläufig aussichtslos erschien.

Es werden nun 30 g Leucinimid in 3 Portionen zu je 10 g mit metallischem Na in der üblichen Weise reducirt. Nach dem Verdünnen mit Wasser und Abdestilliren des Alkohols wurden die 3 Portionen gesondert je 4 Mal mit grossen Mengen Aether extrahirt, die 12 vereinigten Extracte 24 Stunden über Aetzkali entwässert und dann abdestillirt. Der Rückstand wiegt nach dem Trocknen im Exsiccator neben Paraffin 13 g. Die Base wird fractionirt, das Thermometer steigt ganz allmählich von 220—300°, sodass wiederum kein bestimmter Siedepunkt anzugeben ist, wahrscheinlich findet theilweise Zersetzung statt. Die gesondert aufgefangene anscheinend reinste Hauptfraction, die von 220—270° übergang, wiegt 5,2 g. 3,4 g davon werden in das salzsaure Salz verwandelt. Sie werden mit 10 ccm. Wasser und mit HCl zunächst in der Kälte versetzt. Es tritt dabei Blaufärbung ein, die bei noch nicht genügendem HCl-Zusatz nach dem Umrühren immer wieder verschwindet. Da sich ein Theil des Salzes schon auszuschcheiden beginnt, werden noch 50 ccm. Wasser zugesetzt, mit HCl stark übersättigt und gekocht. Es löst sich fast Alles, die Blaufärbung verschwindet. Die heiss filtrirte Lösung, aus der sich nichts ausscheidet, wird nach 5 Stunden nochmals filtrirt und fractionirt in 3 Portionen eingedampft, die zusammen 2,2 g salzsaures Salz lieferten. Da dasselbe sich als in starker Salzsäure schwer löslich erwies, so benutzte ich diese Eigenschaft, um es aus conc. HCl, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt war, umzukrystallisiren. Nach zweimaligem Umkrystallisiren erhielt ich 1,1 g, die zu den Analysen benutzt wurden. Aus der gesammten Mutterlauge wurde ein Pt-Salz dargestellt. Ich erhielt 2,7 g desselben in hellgelben, dünnen Blättchen.

Nach der Extraction der 13 g Base aus dem Reductionsgemisch wird mit HCl neutralisirt, nach 24 Stunden filtrirt, auf den vierten Theil eingeeengt, schwach mit HCl angesäuert und mit Aether extrahirt. Ein Theil der beim Ansäuern ausge-

schiedenen Masse löste sich nicht in Aether, wird abfiltrirt. Die Aetherextracte hinterlassen 4 g zäher, stechend sauer riechender Flüssigkeit, die nach Monaten noch nicht krystallisirt.

- Aus der nach Erschöpfung mit Aether restirenden, grosse Massen NaCl enthaltenden Flüssigkeit erhält man durch oft wiederholtes Eindampfen und Behandeln mit Alkohol und absolutem Alkohol in der früher geschilderten Weise einen zähflüssigen Lack, der nach dem Trocknen bei 100° 9,5 g wiegt und nicht krystallisirt. Eine nähere Untersuchung der bei der Reduction des Leucinimids gewonnenen Nebenprodukte konnte bisher noch nicht vorgenommen werden.

Analyse des salzsauren Salzes der Base.

1.) Cl.-Bestimmung.

0,2236 (bei 100—105° getr.) wurden in kochendem Wasser klar gelöst, 3 Tropfen HNO_3 zugesetzt, mit AgNO_3 -Lösung heiss ausgefällt, nochmals aufgekocht und nach dem Absetzen heiss filtrirt. Aus dem Filtrat schied sich sofort das salpetersaure Salz der Base in feinen Blättchen aus, Spuren davon auch schon auf dem Filter, die durch das Auswaschen mit heissem Wasser in Lösung gebracht wurden. Dann wurde die Bestimmung in üblicher Weise zu Ende geführt. Man erhielt $\text{Ag Cl} = 0,2323 = 0,05747 \text{ Cl.} = 25,7\%$.

Das zurückgewonnene salpetersaure Salz, mehrfach mit verdünnter HNO_3 ausgewaschen, wog trocken 0,22 g, hatte sich also fast quantitativ ausgeschieden. Ueberhaupt scheint es noch schwerer löslich in HNO_3 zu sein, als das salzsaure Salz in HCl . Löst man letzteres in Wasser und setzt HNO_3 zu, so scheidet sich das salpetersaure Salz aus, welches feine Nadeln und Blättchen bildet.

2.) 0,2063 g (bei 100—105° getrocknet) gab
 $0,1915 \text{ H}_2\text{O} = 0,0213 \text{ H} = 10,3\%$ und $0,4002 \text{ CO}_2 = 0,10915 \text{ C} = 52,9\%$.

Das Salz verbrannte äusserst schwer.

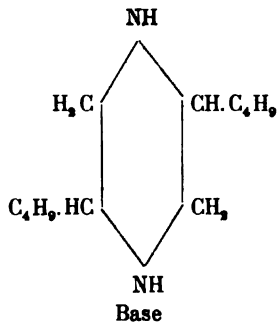
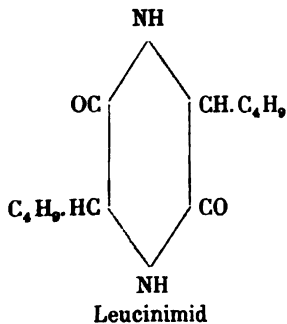
Die Analysen führen zu der Formel $C_6H_{13}N.HCl$, welche verlangt

	gef.
C = 53,1%	C = 52,9%
H = 10,3%	H = 10,3%
Cl = 26,2%	Cl = 25,7%

Es war nun von vorneherein unwahrscheinlich, dass eine Base mit den beschriebenen Eigenschaften, vor Allem mit dem hohen Siedepunkt, die einfache Formel $C_6H_{13}N$ besitze, und es erwies sich daher als nothwendig, ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Da die Base selbst nicht in hierfür genügend reinem Zustande zu erhalten war, bestimmte ich das Molekulargewicht ihrer Muttersubstanz, des Leucinimids, nach der Raoult'schen Methode und fand dabei genau das doppelte Gewicht.

Es wurden angewandt 13,4915 g Phenol; 0,3419 g Substanz. (Dieselbe war mehrmals aus Alkohol umkrystallisirt, dann in conc. H_2SO_4 gelöst, durch Glaswolle filtrirt, mit Wasser ausgefällt, dann noch 3 Mal aus Alkohol umkrystallisirt, hatte den Schmelzpunkt 262° .) Sie löste sich leicht in Phenol beim schwachen Erwärmen. Die Depression des Schmelzpunktes betrug $0,86^\circ$. Daraus berechnet sich $M = \frac{c \cdot p}{t} = \frac{76 \cdot 2,53}{0,86} = 224$. $C_{12}H_{22}N_2O_2$ verlangt $M = 226$.

Am einfachsten erklären sich die Zusammensetzung und die Eigenschaften des bisher sogenannten Leucinimids und der daraus durch Reduction gewonnenen Base, wenn wir für beide eine ringförmige Constitution annehmen, sodass wir folgende Formeln erhalten:



Das Leucinimid wäre danach ein Dioxydibutyldiäthylen-diamin und die Base ein Dibutyldiäthylendiamin, also ein Piperazinderivat, und mit einem solchen theilt sie auch die Eigenschaft, reichliche Mengen Harnsäure zu lösen. Ferner gibt sie die für Piperazinderivate charakteristische Reaction mit Jodwismuthjodkalium; noch in äusserst starker Verdünnung bildet sich damit ein röthlicher Niederschlag, der zuweilen aus rosettenförmig gruppirten prismatischen Krystallen bestand.

Mit der Base stellte ich folgende Thierversuche an:

0,15 g ihres salzsauren Salzes wurden in 10 ccm. Wasser gelöst und bei einem Kaninchen ein Blutdrucksversuch gemacht. Als 5 ccm. der Lösung in einen Ast der v. jugularis langsam eingespritzt waren, sank plötzlich der Blutdruck auf 0, Herzschlag und Athmung standen still und liessen sich nicht wieder hervorrufen. Das Herz enthielt nur flüssiges Blut.

1 ccm. der Lösung, einem Frosch subcutan injicirt, war wirkungslos. 3,5 ccm., enthaltend 0,0525 des salzsauren Salzes, einem Kaninchen Nachmittags 6¹/₂ Uhr subcutan injicirt, waren ebenfalls ohne Wirkung. Der bis zum nächsten Vormittage 11 Uhr entleerte und ausgedrückte Urin enthielt kein Eiweiss, reducirte auch nicht. Er wurde stark alkalisch gemacht und mit Aether extrahirt; der Aetherrückstand reagirte stark alkalisch, gab starke Nebel mit HCl. Seine Lösung in verdünnter HCl gab mit Dragendorff's Reagens eine Fällung und mit Pt Cl₄ ein reichliches Pt-Salz, kleine spitze Blättchen.

0,0370 g (bei 100–105° getrocknet) gaben 0,0119 Pt = 32,2%.

Die Base wird also unverändert und zwar in grossen Mengen ausgeschieden.

Ueberblicken wir das Resultat der mitgetheilten Versuche, so unterliegt es wohl keinem Zweifel, dass meine frühere Auffassung, das bei der Eiweisspaltung durch Säuren in geringen Mengen entstehende eigenthümliche Produkt sei ein Pyridin-

derivat, nicht mehr aufrecht zu erhalten ist. Andererseits kann es auch nicht, wie man bisher geglaubt hat, dasjenige Leucinimid sein, welches sich aus dem bei der Eiweisspaltung durch Säuren in grossen Mengen entstehenden Leucin bildet, da dasselbe andere Eigenschaften, speciell einen um 33° niedrigeren Schmelzpunkt zeigt. Die Annahme, dass es sich um dieses, aber noch durch irgend etwas verunreinigtes Leucinimid handelt, ist wohl von der Hand zu weisen, da ein solches einmal höchstwahrscheinlich einen niedrigeren und nicht um 33° höheren Schmelzpunkt als den des Leucinimids von 262° haben würde, und da es mir ferner auf keine Weise gelungen ist, eine solche Verunreinigung, weder durch häufig wiederholtes Umkrystallisiren aus Alkohol und conc. H_2SO_4 , noch auch durch fractionirtes Auskrystallisirenlassen aus Alkohol nachzuweisen. Auch aus seiner Lösung in heisser conc. HNO_3 und heisser concentrirter Kalilauge, worin er sich schwer löste, fiel der Körper unverändert mit dem Schmelzpunkt 295° wieder aus. Weshalb ich keine genau stimmenden Analysen erhielt, bin ich auch jetzt noch nicht in der Lage, anzugeben, noch neuerdings mit der grössten Sorgfalt vorgenommene Analysen ergaben für die Formel $C_6H_{11}NO$ 0,8 resp. 0,9% C zu wenig, während der H stimmte. Auch Ritthausen¹⁾ erhielt über 1% C zu wenig.

Am meisten Wahrscheinlichkeit hat für mich die Annahme, dass das fragliche Produkt ein Isomeres desjenigen Leucinimids ist, welches aus dem bei der Eiweisspaltung in grossen Massen auftretenden Leucin durch Einwirkung trockner Salzsäure bei etwa 230° zu erhalten ist und aus einem diesem Leucin in geringen Mengen beigemengten isomeren Leucin schon beim blossen Kochen mit wässriger Salzsäure sich bildet. Ferner hat sich das Leucinimid, dessen Formel zu verdoppeln ist, als ein Derivat des Diäthylendiamins erwiesen, und es ist von Interesse, mit welcher Leichtigkeit aus Leucinimid resp. Leucin, also auch aus Eiweiss, die oben beschrie-

1) l. c.

benen Basen, Derivate des Diäthylendiamins, gebildet werden können, besonders mit Rücksicht darauf, dass auch ein im normalen Stoffwechsel vorkommender Körper, das Spermin, wenn es auch nicht, wie man früher annahm, Diäthylendiamin selber ist, so doch vielleicht zu ihm in naher Beziehung steht. Schliesslich wäre auch noch daran zu erinnern, dass die Imide anderer Amidosäuren, wie Glycocoll und Alanin, ebenfalls die doppelte Formel besitzen und daher gleichfalls analoge Basen liefern könnten, und es dürfte sich so vielleicht die Aussicht eröffnen für eine allgemeinere Erklärung der Bildungsweise derartiger im Thierkörper auftretender Basen.

Ueber das Thymin.

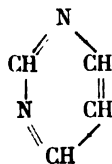
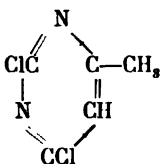
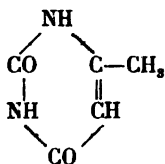
Von

H. Stendel und A. Kossel.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

Hr. Dr. Jones hat im hiesigen Laboratorium einige Versuche zur Aufklärung der Constitution des Thymins unternommen,¹⁾ für welche die Voraussetzung massgebend war, dass das Thymin als ein Derivat des Pyrimidins zu betrachten sei. Diese Vermuthung schien uns desshalb die nächstliegende zu sein, weil das Thymin als Pyrimidinverbindung zu den übrigen Spaltungsprodukten der Nucleinsäuren in eine nahe Beziehung gebracht wird, da die Pyrimidingruppe dem Purinkern zu Grunde liegt.

Wir haben die folgende Untersuchung zur Feststellung dieses vermutheten Zusammenhanges unternommen, indem wir den Plan verfolgen, aus dem Thymin $C_5H_6N_2O_2$ entweder das Pyrimidin selbst oder bekannte Pyrimidinderivate darzustellen. Zu diesem Zweck haben wir zunächst den Sauerstoff des Thymins durch Chlor zu ersetzen versucht, um von diesem Chlorsubstitutionsprodukt aus in ähnlicher Weise zum Pyrimidin zu gelangen, wie Gabriel und Colman²⁾, denen es gelungen ist, das Pyrimidin durch das 4-Methyl-2,6-dichlorpyrimidin hindurch aus dem Methyluracil von Behrend³⁾ zu gewinnen.



Methyluracil, 4-Methyl-2,6-dichlorpyrimidin, Pyrimidin.

1) Diese Zeitschrift. Bd. XXIX, S. 20.

2) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 32, S. 1533.

3) Liebig's Annalen. Bd. 229, S. 8.

Die Versuchsanordnung war eine ähnliche wie bei Gabriel und Colman. 5 g Thymin wurden mit 20 ccm. Phosphoroxychlorid, $1\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflusskühler gekocht, die Hälfte des Phosphoroxychlorids im Vacuum bei 70° abdestillirt. Das zurückbleibende Oel erstarrte in der Kälte zu Krystallen des «Dichlorthymins». Die Krystalle wurden abgesaugt und mit H_2O gewaschen; aus dem Filtrate lassen sich noch geringe Mengen durch Aetherextraction darstellen.

Das Chlorprodukt erwies sich dem von Gabriel und Colman erhaltenen Methyldichlorpyrimidin in mancher Beziehung ähnlich, war jedoch mit demselben nicht identisch. Die Krystalle hatten einen eigenthümlichen Geruch, der nicht so deutlich an Acetamid erinnerte wie der des Gabriel-Colman'schen Körpers. Die Krystalle des Dichlorthymins sind fast unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Aether, Benzol, Chloroform, und krystallisiren bei starkem Abkühlen aus Alkohol in rosettenförmig angeordneten rechteckigen Täfelchen, während der aus Methyluracil gewonnene Körper in Nadeln krystallisirt. Der Schmelzpunkt des Dichlorthymins liegt bei $25-26^{\circ}$ (uncorr.), das 4-Methyl-2,6-dichlorpyrimidin schmilzt bei $46-47^{\circ}$.

Die Analysen des Dichlorthymins ergaben Folgendes:

0,1904 g gaben 0,3350 AgCl = 43,50 % Cl.

0,2020 g > 0,3658 AgCl = 43,55 % Cl.

0,2404 g sättigen ab 29 ccm. $\frac{N}{10}$ Oxalsäure = 16,89% N.

0,2472 g gaben 0,3342 CO_2 und 0,0560 H_2O = 36,88% C
und 2,54% H.

Berechnet für $C_6H_4N_2Cl_2$:

Gefunden:

C 36,82

36,88

H 2,47

2,54

N 17,23

16,89

Cl 43,50

43,55 43,50.

Aus diesen Resultaten ist zu schliessen, dass das von uns aus dem Thymin gewonnene Produkt mit dem 4-Methyl-2,6-dichlorpyrimidin isomer ist. Wir gedenken diese Untersuchungen nach dem oben erwähnten Plane fortzuführen.

Ueber die Schwefelausscheidung nach Leberexstirpation.

Von

Dr. S. Lang (Karlsbad).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 26.)

(Der Redaction zugegangen am 12. März 1900.)

I.

Die in der Litteratur vorliegenden Angaben über die Beziehungen der Leber zur Schwefelausscheidung sind theils experimenteller, theils klinischer Natur und behandeln die Frage im Wesentlichen nach drei Gesichtspunkten: Den Einfluss der Gallenabsonderung, beziehungsweise des Gallenabschlusses auf die Schwefelausscheidung im Harn, die Bedeutung der Leber für die Umwandlung schwefelhaltiger Vorstufen zu Schwefelsäure und die Frage nach dem Orte der synthetischen Bildung der gepaarten Schwefelsäuren.

Die Untersuchungen von Kunkel,¹⁾ welcher bei Gallenfistelhunden durch Mehrzufuhr von Nahrung eine Vermehrung des in die Galle ausgeschiedenen Schwefels und bei Ableitung der Galle eine Abnahme des nicht oxydirten Schwefels im Harne nachwies, wurden von P. Spiro²⁾ und C. v. Voit³⁾

1) A. Kunkel, Ueber das Verhältniss der mit dem Eiweiss verzehrten zu der mit der Galle ausgeschiedenen Schwefelmenge. Arbeiten der physiolog. Anstalt Leipzig. Bd. 10. Ueber den Stoffwechsel des Schwefels im Säugethierkörper, Pflüger's Archiv Bd. 14, S. 344.

2) P. Spiro, Ueber die Gallenbildung beim Hunde. Du Bois' Archiv für Physiologie, 1880. Suppl.

3) C. v. Voit, Ueber die Beziehungen der Gallenabsonderung zum Gesamtstoffwechsel im thierischen Organismus. Festschrift der Universität München zur Feier des 300 jährigen Bestehens der Universität Würzburg, 1882.

im Wesentlichen bestätigt. Es fehlt im Harn das aus den Gallensäuren abgeschiedene Taurin, welches nach v. Voit die Hauptquelle des nicht oxydirten Schwefels bildet. Zugleich schloss Kunkel das Taurin als Vorstufe der Schwefelsäure aus, weil es als solches ausgeschieden werde. Diese Auffassung erhielt eine Stütze durch Salkowski's¹⁾ Angaben, welcher zeigte, dass eingeführtes Taurin vom Menschen und Hund z. Th. als solches, z. Th. als Taurocarbaminsäure ausgeschieden wird.

Lépine und Flavard²⁾ fanden bei Behinderung des Gallenflusses eine Vermehrung des nicht oxydirten Schwefels; dieselben Autoren in Gemeinschaft mit Guérin³⁾ gleichfalls eine Erhöhung des nicht oxydirten Schwefels bei Hunden mit künstlich erzeugtem Icterus (Unterbindung des duct. choledoch. und Erzeugung von Ueberdruck durch eine mit der Gallenblase in Verbindung gesetzte Quecksilbersäule); zugleich unterschieden sie den nicht oxydirten Schwefel in einen leicht und schwer oxydirbaren (je nachdem er durch Salzsäure und chloresäures Kalium oder erst durch Schmelzen mit Natriumcarbonat und Kalisalpeter in Schwefelsäure übergeführt werden konnte). Dieser letztere soll in charakteristischer Weise bei Leberleiden vermehrt sein und zum grössten Theile dem Taurin entsprechen.⁴⁾

F. Müller⁵⁾ konnte bei chronischem Icterus eine Vermehrung des organischen Schwefels nicht nachweisen, hingegen stellte er bei dem Hungerkünstler Cetti eine Vermehrung des neutralen Schwefels absolut und relativ (im Verhältniss zur Schwefelsäure) fest.⁶⁾ In neuerer Zeit fanden Reale und

1) Salkowski, Virchow's Archiv, Bd. 58.

2) R. Lépine et Flavard, Sur l'excrétion par l'urine de soufre incomplètement oxydé dans divers états pathologiques du foie. *Compt. rend. T. 91.*

3) R. Lépine, Flavard et Guérin, Un nouveau symptôme de trouble de la fonction biliaire, *Revue de médecine T. 1.*

4) R. Lépine et Guérin. *Compt. rend. T. 97.*

5) Fr. Müller, *Zeitschr. für klin. Medicin*, Bd. 12.

6) Fr. Müller, Bericht über die Ergebnisse des an Cetti ausgeführten Hungerversuches. *Berliner Klin. Wochenschrift*, 1887, Nr. 24.

Velardi¹⁾ in einem Falle von hypertrophischer Cirrhose und katarrhalischem Icterus eine Steigerung des Gesamtschwefels und eine Vermehrung des neutralen Schwefels im Verhältniss zur Schwefelsäure, während in zwei Fällen von gewöhnlicher Cirrhose der neutrale Schwefel auf normaler Höhe blieb und die Gesamtschwefelmenge subnormal war. Nach ihnen bewirken Lebererkrankungen eine Vermehrung des neutralen Schwefels, unabhängig von der Cholämie.

Voirin und Lambert²⁾ untersuchten den Einfluss verschiedener Gifte auf das Verhältniss von schwer oxydirbarem Schwefel zum Gesamtschwefel bei Hunden. Dasselbe stieg unter der Darreichung von Phosphoröl (gleichzeitig mit dem Einsetzen von Icterus), ebenso bei Anlegung einer Eck'schen Fistel, sowie bei Injection von Phosphorsäure in den ductus choledochus.

Malerba³⁾ schickte defibrinirtes Blut, in welchem käufliches Pepton mit viel abspaltbarem Schwefel gelöst war, durch überlebende Leber und fand, dass der Schwefel abgespalten und wahrscheinlich weiter oxydirt werde; hingegen hatte zerkümmerte Lebersubstanz völlig die Fähigkeit verloren, «das den labil gebundenen Schwefel enthaltende Molekül umzuwandeln». Benedict⁴⁾ beobachtete Vermehrung des cystinähnlichen Körpers bei Kranken, welche an einer Störung der Leberfunction litten; bei Lebercirrhose und katarrhalischem Icterus gelang es ihm, in mehreren Fällen beträchtlichere Mengen eines bleischwärenden Schwefelkörpers nachzuweisen. Die Einwirkung der Leber auf (schwefelhaltige) Vorstufen der Schwefelsäure wurde bislang nicht geprüft; ein einzelner Versuch von

1) Reale und Velardi, Ueber die Ausscheidung des neutralen Schwefels durch den Harn. Archiv f. Verdauungskrankh. Bd. 2.

2) Voirin und Lambert, Experimentelle Untersuchungen über die Ausscheidung des Schwefels durch den Urin. Archives de physiologie T. 27, p. 59.

3) Malerba, Ueber das Verhalten des Eiweisschwefels im Organismus. Rendic. d. R. Acc. Sc. fis. e matem. di Napoli, fasc II. 1897.

4) Benedict, Ueber die Ausscheidung des Schwefels in patholog. Zuständen. Zeitschr. für klin. Medicin, Bd. 36.

Jacoby,¹⁾ der unterschwefligsaures Natron mit Leberbrei digerirte und auf etwa entstandene Schwefelsäure prüfte, fiel negativ aus.

Bezüglich der Aetherschwefelsäuren hat Baumann²⁾ die Vermuthung geäußert, dass ihre Synthese in der Leber stattfindet, weil er hier mehr gepaarte Schwefelsäure fand als in anderen Organen. Kochs³⁾ konnte ausser mit Leber auch mit Niere und Pancreas aus zugesetztem schwefelsauren Salz und Phenolen die Synthese der Aetherschwefelsäuren, doch nur in minimalen Mengen, erzielen. Dass sich dieselbe im Organismus normaler Weise leicht vollzieht, ist durch Versuche Tauber's⁴⁾ zweifelhaft geworden; demselben gelang es nicht durch Zufuhr reichlicher Gaben von schwefelsaurem Natron eine Beschleunigung der Synthese und so eine Entgiftung gerade tödtlicher Phenolmengen zu erreichen. Landi⁵⁾ fand bei Wiederholung der Versuche Kochs', dass die Synthese nicht in der Leber, sondern in der Darmwand stattfindet. Von Wichtigkeit ist eine gelegentliche Bemerkung Minkowski's,⁶⁾ nach welcher in einigen Versuchen bei entlebten Gänsen mit Sicherheit gepaarte Schwefelsäuren nachgewiesen werden konnten.

Die vorliegenden klinischen Beobachtungen, welche sich auf die Ausscheidung der gepaarten Schwefelsäuren bei Leber-

1) M. Jacoby, Ueber die Oxydationsfermente der Leber. Virchow's Archiv 157, 1899.

2) Baumann, Pflüger's Archiv 13. Diese Zeitschr. Bd. VI. 1882.

3) Kochs, Ueber eine Methode zur Bestimmung der Topographie des Chemismus im Organismus. Pflüger's Archiv 20, 64.

Kochs, Fortgesetzte Untersuchungen über die Bildungsstätten der Aetherschwefelsäuren. Pflüger's Archiv 23, 161.

4) S. Tauber, Ueber die entgiftende Wirkung der schwefels. Salze etc. Archiv f. exp. Path. 36.

5) Landi, Jahresb. f. Thierchemie 1897, S. 645.

6) O. Minkowski, Die Störungen der Leberfunction. Ergebnisse der allgem. Pathologie und path. Anatomie (Lubarsch-Ostertag), 1897. S. 740, Fussnote.

krankheiten beziehen, sind für die Frage nach den Bildungsstätten der Aetherschwefelsäuren schwer verwerthbar, weil Veränderungen in ihren Mengenverhältnissen als Ausfallserscheinungen der Gallenwirksamkeit im Darne und als Folgen complicirender Darmveränderungen zu deuten sind. Finizio¹⁾ fand bei Leuten mit gesunder Leber nach Thymoldarreichung ein Ansteigen der gepaarten Schwefelsäuren, welches bei Personen mit Leberkrankheiten viel geringer war, oder ganz ausblieb. Er sieht darin eine Bestätigung der Ansicht, dass der Sitz der Aetherschwefelsäuresynthese in der Leber zu suchen sei. Münzer²⁾ fand starke Vermehrung der Aetherschwefelsäuren bei Phosphorvergiftung am Menschen, «sobald es zu allgemeinen Vergiftungserscheinungen, zu erhöhtem Eiweisszerfall gekommen ist». Reale³⁾ berichtet von einer starken Zunahme der Aetherschwefelsäuren in seinen Versuchen über den Einfluss von Sauerstoffmangel auf den Stoffwechsel und führt dieselbe ebenfalls auf vermehrten Eiweisszerfall zurück.

II.

Wenn der Leber, wie zu erwarten stand, ein hervorragender Einfluss auf die Ausscheidung des Schwefels zukam, so musste sich dieser am einfachsten durch Ausschaltung der Leberfunction und Untersuchung der Schwefelcomponenten im nachher entleerten Harne erweisen lassen. Unbedingtes Erforderniss ist, dass die Thiere die Operation lange genug überleben, um im Harne die Veränderung des Stoffwechsels erkennen zu lassen. Die Methoden der Leberausschaltung beim Säugethier entsprachen dieser Anforderung leider nicht; es wurden daher Gänse zu den Untersuchungen benützt, welche, wie Minkowski⁴⁾ in seiner schönen Arbeit gezeigt hat, den

¹⁾ G. Finizio, Contributo alla conoscenza della sede della sintesi degli eteri solforici. Riv. chim. e terap. fasc. 8, 1897.

²⁾ E. Münzer, Deutsches Archiv f. klin. Med. Bd. 52.

³⁾ Reale, Wiener med. Wochenschrift, 1895. Nr. 24—27.

⁴⁾ O. Minkowski, Ueber den Einfluss der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel, Archiv f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. XXI.

immerhin schweren Eingriff gut vertragen und viele Stunden die Operation überleben.

Um zu klaren und verwerthbaren Resultaten bezüglich des unoxydirten Schwefels zu gelangen, wurde nur auf eine bestimmte, wohl charakterisirte Componente desselben Rücksicht genommen, den durch Alkali abspaltbaren, bleischwärenden Schwefel, dessen Beziehung zur Schwefelsäurebildung am wahrscheinlichsten war. Von bisher bekannten Substanzen des «neutralen Schwefels» gehören dieser Gruppe an die unterschweflige Säure, das Cystin und der cystinähnliche Körper des Harns. Bezüglich der ersteren haben es Untersuchungen von Heffter¹⁾ und Salkowski,²⁾ bezüglich der letzteren Untersuchungen von Goldmann³⁾ wahrscheinlich gemacht, dass ein Theil derselben als Vorstufen der Schwefelsäure aufzufassen sei.

Die Leberexstirpation — in einigen Versuchen wurden nur alle zur Leber führenden Gefässe unterbunden mit gleichem Resultat wie bei der Totalexstirpation — wurde nach der von Minkowski⁴⁾ beschriebenen Methode ausgeführt; vorherige Unterbindung des Rectum, um den Harn kothfrei zu erhalten, konnte nicht ausgeführt werden, weil jedem Versuche ein oder mehrere Vorversuche behufs Bestimmung der Zusammensetzung des normalen Harnes an demselben Thiere vorausgingen, und andererseits die durch Unterbindung des Rectum bewirkte Kothstauung eine Aenderung im Verhältniss der Schwefelsäuren herbeiführen konnte. Der Harn der normalen Thiere wurde möglichst gut vom Kothe abgegossen, dann durch Seide colirt. Da das Filtriren durch die mucinähnliche Substanz des Gänseharns ausserordentlich erschwert war, wurde der Harn nach

1) Heffter, Die Ausscheidung des Schwefels im Harn. Pflüger's Archiv Bd. 38, 476.

2) Salkowski, Ueber das Verhalten der Isäthionsäure im Organismus. Pflüger's Archiv Bd. 39.

3) E. Goldmann, Ueber das Schicksal des Cysteins und die Entstehung der Schwefelsäure im Thierkörper. Zeitschr. f. phys. Chemie Bd. IX, S. 260.

4) Minkowski l. c.

dem Coliren durch Seide mit Salzsäure, resp. mit Essigsäure (im Falle der Sulfatbestimmung) versetzt und circa eine Stunde lang am Wasserbade bei aufgesetztem Kühlrohr erhitzt.¹⁾ Hier- nach ging das Filtriren leicht von Statten; der Harn der operirten Thiere konnte meist direkt ohne vorheriges Coliren verarbeitet werden, da fast ausnahmslos nach der Operation kein Koth mehr entleert wurde.

Die Thiere wurden gleichmässig gefüttert, in den ersten Versuchen mit Mais, in den späteren mit Hafer; bei letzterer Fütterung war die Diurese reichlicher, doch gelang es mir nie, mehr als 100 ccm. Harn zu erhalten, auch wenn die Thiere relativ lange (über 12 Stunden) lebten.

In den Harnen wurde der Gesamtschwefel nach dem Verfahren von v. Asbóth,²⁾ der abspaltbare Schwefel nach der Methode von F. Schulz³⁾ und die Schwefelsäuren nach Bau- mann-Salkowski bestimmt.

Ich lasse nun die Versuchsprotocolle in gekürzter Form folgen.

Versuch I.

a) Normalperiode.

Der Harn wurde von 2 Tagen gesammelt (unter Toluolzusatz).

Gesamtschwefel: In 33,45 g Harn wurden gefunden

$$0,1168 \text{ g BaSO}_4 = 0,3492 \% \text{ (als BaSO}_4\text{)}.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 35,13 g Harn wurden gefunden

$$0,0105 \text{ g BaSO}_4 = 0,0298 \%. .$$

$$\text{S : Sa}^4) = 100 : 8,5.$$

Harn vom nächsten Tage.

Gesamtschwefel: In 14,3 g Harn wurden gefunden

$$0,0622 \text{ g BaSO}_4 = 0,4349 \%. .$$

Abspaltbarer Schwefel: In 64,58 g Harn wurden gefunden

$$0,0227 \text{ g BaSO}_4 = 0,03515 \%. .$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 8,08.$$

1) Da kein Grund für die Annahme der Anwesenheit von unter- schwefliger Säure vorlag, war der Säurezusatz nicht störend.

2) Asbóth, Chemikerzeitung 1895, S. 2040.

3) F. N. Schulz, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss. Diese Zeitschr. Bd. XXVI.

4) S bedeute Gesamtschwefel, Sa abspaltbaren Schwefel, S_A und S_B den Schwefel der präformirten und der Aether-Schwefelsäure.

b) Harn nach der Leberausschaltung.

Unterbindung sämtlicher zur Leber führenden Gefäße; Operation beendet um 12 Uhr; in der Nacht Tod.

Gesamtschwefel: In 4,8 g Harn wurden gefunden

$$0,1159 \text{ g BaSO}_4 = 2,414 \text{ } \%$$

Abspaltbarer Schwefel: In 16,88 g Harn wurden gefunden

$$0,0524 \text{ g BaSO}_4 = 0,3104 \text{ } \%$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 12.$$

Versuch II.

Normalperiode.

Gesamtschwefel: In 10,55 g Harn wurden gefunden

$$0,0496 \text{ g BaSO}_4 = 0,4701 \text{ } \%$$

Abspaltbarer Schwefel: In 41,5 g Harn wurden gefunden

$$0,0190 \text{ g BaSO}_4 = 0,045 \text{ } \%$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 9,3.$$

120 g normaler Harn desselben Thieres wurden mit 20 g Salzsäure gekocht, filtrirt. Von der Mischung wurden genommen für die Bestimmung des

Gesamtschwefels: 15 g (entsprechend 12,85 g Harn), in diesen finden sich

$$0,0371 \text{ g BaSO}_4 = 0,2887 \text{ } \%$$

Gesamtschwefelsäure: In 50 g (entsprechend 42,85 g Harn) finden sich

$$0,0429 \text{ g BaSO}_4 = 0,1001 \text{ } \%$$

$$\text{S : S}_{\text{A+B}} = 100 : 34,6.$$

Dieser Versuch sei nur als Material zur Kenntniss der normalen Verhältnisse angeführt. Das Thier starb zwei Stunden nach der Operation, ohne Harn entleert zu haben.

Versuch III.

a) Normalperiode.

30,9 g Harn wurden mit 5 g Salzsäure am Wasserbade erhitzt, filtrirt. Im Filtrate finden sich

Gesamtschwefel: In 6 g (= 5,19 g Harn)

$$0,0477 \text{ g BaSO}_4 = 0,919 \text{ } \%$$

Abspaltbarer Schwefel: In 18,1 g (= 15,55 g Harn)

$$0,020 \text{ g BaSO}_4 = 0,1286 \text{ } \%$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 13,9.$$

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 10½ Uhr. Tod um 5 Uhr Nachmittags. 10 g Harn wurden mit 2 g HCl am Wasserbade erhitzt:

Gesamtschwefel: In 2 g (= 1,666 g Harn) finden sich

$$0,0177 \text{ g BaSO}_4 = 1,062 \text{ ‰}.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 10 g (= 8,333 g Harn) finden sich

$$0,0118 \text{ g BaSO}_4 = 0,1416 \text{ ‰}.$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 13,3.$$

Versuch IV.

a) Normalperiode.

47,6 g Harn werden mit 8,4 g HCl am Wasserbade gekocht und filtrirt.

Gesamtschwefel: In 8,2 g (= 6,97 g Harn) finden sich

$$0,0400 \text{ g BaSO}_4 = 0,5739 \text{ ‰}.$$

Gesamt-Schwefelsäure: In 19,25 g (= 16,36 g Harn) finden sich

$$0,0625 \text{ g BaSO}_4 = 0,3820 \text{ ‰}.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 23,1 g (= 19,63 g Harn) finden sich

$$0,0293 \text{ g BaSO}_4 = 0,1492 \text{ ‰}.$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 39$$

$$\text{S : S}_{A+B} = 100 : 66,5.$$

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 11¹/₄ Uhr; Tod um 6¹/₄ Uhr Abends.

Gesamtschwefel: In 2 g Harn finden sich

$$0,0275 \text{ g BaSO}_4 = 1,375 \text{ ‰}.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 5,7 g Harn finden sich

$$0,0158 \text{ g BaSO}_4 = 0,2772 \text{ ‰}.$$

$$\text{S : Sa} = 100 : 20,1.$$

Versuch V.

a) Normalperiode.

Der Harn wurde von 4 Tagen gesammelt.

155 g Harn wurden mit 20 g HCl gekocht.

Gesamtschwefel: In 20,25 g (= 17,93 g Harn) wurden gefunden:

$$0,0487 \text{ g BaSO}_4 = 0,2716 \text{ ‰}.$$

Gesamtschwefelsäure: In 34,75 g (= 30,77 g Harn) wurden gefunden:

$$0,0201 \text{ g BaSO}_4 = 0,0653 \text{ ‰}.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 88 g (77,94 g Harn) wurden gefunden:

$$0,0224 \text{ g BaSO}_4 = 0,02874 \text{ ‰}.$$

32 g Harn mit 10,35 g Essigsäure gekocht:

Präformirte Schwefelsäure: In 32,1 g (= 24,25 g Harn) finden sich:

$$0,0155 \text{ g BaSO}_4 = 0,0639 \text{ ‰}.$$

Aetherschwefelsäuren als Differenz berechnet = 0,0014 ‰.

$$\text{S : Sa} = 100 : 10,5$$

$$\text{S : S}_{A+B} = 100 : 24$$

$$\text{A : B} = 100 : 2,19.$$

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet: 11 $\frac{1}{2}$ Uhr; Tod um 11 Uhr Nachts.

Gesamtschwefel: In 3,74 g Harn finden sich:

$$0,054 \text{ g BaSO}_4 = 1,443\%$$

Präformirte Schwefelsäure: In 10,84 g Harn finden sich:

$$0,0892 \text{ g BaSO}_4 = 0,823\%$$

Im Filtrate davon werden bestimmt die Aetherschwefelsäuren:

Es finden sich 0,0032 g BaSO₄ = 0,0295%.

Gesamtschwefelsäure als Summe berechnet: 0,8525%

$$S : Sa = 100 : 6,8$$

$$S : S_{A+B} = 100 : 59$$

$$A : B = 100 : 3,5.$$

Versuch VI.

a) Normalperiode.

Harn von 3 Tagen gesammelt.

200 ccm. Harn wurden mit 20 ccm. HCl am Wasserbade gekocht und filtrirt.

Gesamtschwefel: In 20 ccm. (= 18,18 ccm. Harn)

$$0,0382 \text{ g BaSO}_4 = 0,210\%.$$

Gesamtschwefelsäure: In 40 ccm. (= 36,36 ccm. Harn)

$$0,0107 \text{ g BaSO}_4 = 0,0294\%.$$

Zur direkten Bestimmung der Aetherschwefelsäuren wurden 36 ccm. Harn mit 64 ccm. einer Lösung von Baryumhydrat und Baryumchlorid ausgefällt, vom Filtrate 50 ccm. für die Bestimmung verwendet.¹⁾

Aetherschwefelsäuren: In 50 ccm. des Filtrates (= 18 ccm. Harn)

$$0,0006 \text{ g BaSO}_4 = 0,0033\%.$$

$$S : S_{A+B} = 100 : 14$$

$$A : B = 100 : 12.$$

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 12 Uhr 30; um 9 Uhr Abends lebt das Thier noch; früh todt gefunden.

Gesamtschwefel: In 5 ccm. Harn 0,0608 g BaSO₄ = 1,216%.

Gesamtschwefelsäure: In 20 ccm. Harn 0,1046 g = 0,5230%.

Präformirte Schwefelsäure: In 7 ccm. Harn 0,0370 g.

$$S : S_{A+B} = 100 : 43 = 0,528\%.$$

¹⁾ Diese Art der Bestimmung erwies sich, wie auch im folgenden Versuche ersichtlich war, nicht als zweckmässig; beim Erhitzen der barythaltigen Flüssigkeit mit HCl schied sich neben BaSO₄ ein dunkelgefärbter Niederschlag aus, der auf dem Filter durch Alkohol nur zum Theil entfernt werden konnte; der Rest wurde erst durch Glühen des Niederschlags nach Benetzung mit Salpetersäure beseitigt.

Versuch VII.

a) Normalperiode.

Harn von 3 Tagen gesammelt.

Statt mit Salzsäure zu erhitzen, wurde in diesem Falle der Versuch gemacht, die mucinartige Substanz durch Erzeugung eines dichten indifferenten Niederschlages zu fällen. Es wurden 450 ccm. Harn mit 20 ccm. schwefelsäurefreien Magnesiumchlorids und 90 ccm. Ammoniak versetzt und filtrirt; das angestrebte Ziel wurde nur sehr unvollkommen erreicht.

Gesamtschwefel: In 20 ccm. des Filtrates (= 18 ccm. Harn) fanden sich: $0,0441 \text{ g BaSO}_4 = 0,245\%$.

Gesamtschwefelsäure: In 150 ccm. (= 135 ccm. Harn) fanden sich: $0,1467 \text{ g BaSO}_4 = 0,1086\%$.

Aetherschwefelsäuren: 100 ccm. desselben Harnes wurden mit 40 ccm. der Barytmischung versetzt; in 70 ccm. des Filtrates (= 50 ccm. Harn) fanden sich: $0,0050 \text{ g BaSO}_4 = 0,01\%$.

$$S : S_{A+B} = 100 : 44$$

$$A : B = 100 : 10,1.$$

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 12 Uhr; um 10 Uhr Abends lebt das Thier noch; am nächsten Morgen todt gefunden.

Gesamtschwefel: In 5 ccm. Harn wurden gefunden:

$$0,0211 \text{ g BaSO}_4 = 0,422\%.$$

Gesamtschwefelsäure: In 20 ccm. Harn $0,0325 \text{ g BaSO}_4 = 0,1625\%$.

Präform. Schwefelsäure: In 20 ccm. Harn $0,0317 \text{ g BaSO}_4 = 0,1585\%$.

Aetherschwefelsäuren als Differenz = $0,004\%$.

$$S : S_{A+B} = 100 : 38,5$$

$$A : B = 100 : 2,5.$$

Versuch VIII.

a) Normalperiode.

Haferfütterung. Harn von 4 Tagen gesammelt. 250 ccm. mit 20 g HCl gekocht und filtrirt.

Gesamtschwefel: In 20 ccm. (= 18,5 ccm. Harn) wurden gefunden:

$$0,0529 \text{ g BaSO}_4 = 0,2859\%.$$

Gesamtschwefelsäure: In 100 ccm. (= 92,5 ccm. Harn) wurden gefunden:

$$0,093 \text{ BaSO}_4 \text{ g} = 0,1005\%.$$

150 ccm. desselben Harnes mit 20 ccm. Essigsäure gekocht.

Präformirte Schwefelsäure: In 100 ccm. (= 88,20 ccm Harn)

$$0,092 \text{ g BaSO}_4 = 0,104\%.$$

Abspaltbarer Schwefel: In 50 ccm. (= 44,1 ccm. Harn)

0,0384 g BaSO_4 = 0,0870%.

S: Sa = 100: 30,4

S: $\text{SA}+\text{B}$ = 100: 35,1.

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 12 Uhr; das Thier lebt noch um 10 Uhr Abends und ist munter; am nächsten Morgen todt gefunden.

Gesamtschwefel: In 10 ccm. Harn 0,0748 g BaSO_4 = 0,748%.

Gesamtschwefelsäure: In 20 ccm. Harn 0,0800 g BaSO_4 = 0,400%.

Präformirte Schwefelsäure: In 20 ccm. Harn 0,0805 g BaSO_4 = 0,4025%.

Abspaltbarer Schwefel: In 25 ccm. 0,0356 g BaSO_4 = 0,1424%.

S: Sa = 100: 19,04.

S: $\text{SA}+\text{B}$ = 100: 53,4.

Versuch IX.

a) Normalperiode.

Haferfütterung. 150 ccm. Harn mit 20 ccm. HCl gekocht.

Gesamtschwefel: In 20 ccm. (= 17,64 ccm. Harn) wurden gefunden:

0,0519 g BaSO_4 = 0,2942%.

Gesamtschwefelsäure: In 100 ccm. (= 88,2 ccm. Harn)

0,0765 g BaSO_4 = 0,08673%.

Abspaltbarer Schwefel (bestimmt im Filtrate von der Gesamtschwefelsäure = 88,2 ccm. nativer Harn)

0,0788 BaSO_4 g = 0,0893%.

Aetherschwefelsäuren: 150 ccm. Harn mit 20 ccm. Essigsäure gekocht, filtrirt; in 50 ccm. des Filtrates werden die Sulfate durch BaCl_2 ausgefällt und im Filtrate hiervon die gepaarten Schwefelsäuren bestimmt:

0,005 g BaSO_4 = 0,011%

S: Sa = 100: 30,3

S: $\text{SA}+\text{B}$ = 100: 29,49

A: B = 100: 14.

b) Harn nach der Leberexstirpation.

Operation beendet um 1 Uhr; das Thier ist um 9 Uhr Abends noch munter; am nächsten Morgen todt gefunden. 60 ccm. Harn mit 15 ccm. Essigsäure gekocht.

Gesamtschwefel: In 5 ccm. (= 4 ccm. Harn) wurden gefunden:

0,0362 g BaSO_4 = 0,905%.

Gesamtschwefelsäure: In 7 ccm. (= 5,6 ccm. Harn)

0,0216 g BaSO_4 = 0,3857%.

Abspaltbarer Schwefel: In 20 ccm. (= 16 ccm. Harn)

0,0216 g BaSO_4 = 0,1350%.

Sulfate: In 10 ccm. (= 8 ccm. Harn)

0,038 g BaSO₄ = 0,385%.

Aetherschweifelsäuren als Differenz berechnet = 0,0007%, im Filtrate von den Sulfaten bestimmt: 0,001%

S: Sa = 100 : 14,9.

S: S_{A+B} = 100 : 40,9.

A: B = 100 : 2,2.

Für die Beurtheilung der Frage, in welchem Maasse eine Verschiebung der einzelnen, den Gesamtschwefel constituirenden Bestandtheile stattgefunden hat, kamen nicht die absoluten Mengen der ausgeschiedenen Schwefelcomponenten in Betracht, sondern ihr Verhältniss zur Gesamtschwefelausscheidung. Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht der gefundenen Procentzahlen:

Verhältniss von Gesamtschwefel zu abspaltbarem Schwefel.

Normal.	Nach der Leberexstirpation.
Versuch I . . . 100 : 8	100 : 12
Versuch III . . . 100 : 13	100 : 13
Versuch IV . . . 100 : 39	100 : 20
Versuch V . . . 100 : 10	100 : 6,8
Versuch VIII . . . 100 : 30	100 : 19
Versuch IX . . . 100 : 30	100 : 14,9

Verhältniss von Gesamtschwefel zu Gesamtschwefelsäure.

Versuch V . . . 100 : 24	100 : 59
Versuch VI . . . 100 : 14	100 : 43
Versuch VII . . . 100 : 44	100 : 38
Versuch VIII . . . 100 : 35	100 : 53
Versuch IX . . . 100 : 29	100 : 40,9

Verhältniss von präformirter zu gepaarter Schwefelsäure A = 100.

Versuch V . . . 100 : 2,19	100 : 3,5
Versuch VI . . . 100 : 12	Keine Aetherschweifelsäure gefunden
Versuch VII . . . 100 : 10	100 : 2,5
Versuch VIII Keine Aetherschweifelsäure	Keine Aetherschweifelsäure
Versuch IX . . . 100 : 14	100 : 2,2

III.

Aus der vorstehenden Zusammenstellung ergibt sich das überraschende Resultat, dass eine merkliche Aenderung in der

Ausscheidung des abspaltbaren Schwefels nach der Leberausschaltung nicht eintritt. Die nach der Operation gefundenen Procentzahlen unterliegen keinen grösseren Schwankungen als die der normalen Thiere. Der Leber kommt also ein wesentlicher Antheil an der Ausscheidung des abspaltbaren Schwefels nicht zu.

Ueber die Beziehungen des abspaltbaren Schwefels zur Schwefelsäurebildung überhaupt gestatten diese Versuche keinen Schluss. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Oxydation der abspaltbaren Schwefelgruppen zur Schwefelsäure eine allgemeine Function der Körpergewebe ist und die Leber hierbei keine andere Rolle spielt als irgend ein anderes, lebhaft functionirendes Organ. In diesem Falle ist es denkbar, dass der Ausfall an Schwefelsäurebildung keine bemerkenswerthe Zunahme von abspaltbarem Schwefel im Harne veranlasst. Es wäre auch noch möglich, dass die Ausscheidung desselben nach der Leberexstirpation durch einen im entgegengesetzten Sinne, d. h. im Sinne der Verminderung wirkenden Vorgang beeinflusst werde, dessen Vorhandensein durch die ziemliche Constanz der in meinen Versuchen gefundenen Normalwerthe für abspaltbaren Schwefel nahegelegt wird.¹⁾

Ein Theil desselben könnte direkt der Zellthätigkeit seinen Ursprung verdanken und als normales Zerfallsprodukt derselben zur Ausscheidung gelangen.²⁾ Bei Wegfall eines so zellenreichen Organs, wie die Leber ist, könnte immerhin der auf sie entfallende Antheil an abspaltbarem Schwefel eine Verringerung des im Harne auftretenden abspaltbaren Schwefels wie auch des Gesamtschwefels veranlassen. Wie sich dann das Verhältniss von Gesamtschwefel zu abspaltbarem Schwefel ändert, hängt davon ab, ob die oxydative Leistung der Leber der anderer Organe überlegen ist oder nicht. Die zahlreichen, über das Verhalten des neutralen Schwefels unter verschiedenen

1) Ueber die Verhältnisse des abspaltbaren Schwefels im Hundeharn hat Herr Dr. Petry im hiesigen Institute Versuche ausgeführt, welche zu einem ähnlichen Resultate führten, und über die nächstens berichtet werden wird.

2) Einer ähnlichen Vorstellung hat Benedict (l. c.) bezüglich des neutralen Schwefels Ausdruck gegeben.

Umständen vorliegenden Beobachtungen sind zu Schlüssen in dieser Richtung nicht verwertbar, weil sie nur die Totalsumme des unoxydirten Schwefels betreffen, dessen einzelne Bestandtheile wohl keinem einheitlichen Stoffwechselvorgange ihre Entstehung verdanken.

Aber auch die Tabelle der Schwefelsäureausscheidung zeigt kein Abweichen von den normalen Zahlen im Sinne einer Verminderung. Die in einigen Versuchen beobachtete Erhöhung des Verhältnisses von Gesamtschwefelsäure zu Gesamtschwefel nach der Leberexstirpation findet wohl darin ihre Erklärung, dass die der Galle entstammenden Schwefelverbindungen vom Gesamtschwefel in Wegfall gekommen sind, ein gleiches Ergebniss, wie es Kunkel durch Ableiten der Galle nach aussen erzielte.

Die Angabe Minkowski's,¹⁾ dass er im Harne entleerter Gänse keine Schwefelsäure nachzuweisen vermochte, dürfte dem Umstande zuzuschreiben sein, dass seine Thiere zwölf Stunden vorher gehungert hatten (wie er selbst ausdrücklich hervorhebt) und einen sehr reichlichen, offenbar sehr verdünnten Harn entleerten; an späterer Stelle berichtet er übrigens von dem sicheren Befunde gepaarter Schwefelsäure.²⁾

Bezüglich der letzteren kann aus den Zahlen meiner Versuche ein sicherer Schluss nicht gezogen werden, weil sie sich meist knapp an den Fehlergrenzen der Bestimmung bewegen. Die ausgeschiedenen Mengen waren schon normaler Weise recht klein; doch ist jedenfalls zu ersehen, dass die Aetherschwefelsäuren nach der Leberexstirpation nicht fehlen, und somit ist kein Grund vorhanden, die Synthese derselben als eine ausschliesslich an die Leber geknüpfte Function zu betrachten.

Bei Zusammenfassung der gefundenen Thatsachen komme ich somit zu dem Schlusse, dass im Vogelorganismus der Leber eine wesentliche Rolle bei der Bildung der Schwefelsäure aus dem Schwefel der Nahrung nicht zukommt.

1) O. Minkowski, Archiv f. exp. Path. u. Pharmak. XXI.

2) O. Minkowski, Die Störungen der Leberfunction. (Lubarsch-Ostertag) 1897, S. 740.

Ursprung des Lysins	l	t	p	d	α_D	$(\alpha)_D$ für	
						$C_6H_{14}N_2O_7 \cdot 2HCl$	$C_6H_{14}N_2O_7$
I. Casein	6 dm.	18° C.	4,4560	1,0128	+ 3,94	+ 14,62	21,93
II. Fibrin(Pankreasverd.)	6 >	20° >	3,0000	1,0089	+ 2,78	+ 15,29	22,93
III. Spongin	4 >	19° >	2,0030	1,0065	+ 1,12	+ 14,03	21,05
IV. Casein	6 >	20° >	3,7074	1,0098	+ 3,37	+ 15,05	22,57
V. Unbekannt	6 >	20° >	2,7884	1,0071	+ 2,56	+ 15,25	22,87
VI. Unbekannt	4 >	19° >	4,6700	1,0127	+ 2,88	+ 15,30	22,95

Lawrow fand $(\alpha)_D = 15,5$ (in 2,8% iger Lösung).

Diese Prüfung der physikalischen Eigenschaften des Lysinchlorids wurde durch Stickstoffbestimmungen ergänzt. Bei Anwendung der Kjeldahl'schen Methode zeigten sich die Stickstoffwerthe stets zu niedrig, mochte ich Kupfersulfat oder Quecksilberoxyd als oxydirendes Mittel anwenden, oder Kaliumsulfat hinzufügen, sie betrugen 9,7 bis 10,3%, während die Theorie 12,8% verlangt. Volumetrische Analysen ergaben hingegen 13,0 und 13,3% Stickstoff in zwei verschiedenen Präparaten. Die Kjeldahl'sche Methode ist also zur Untersuchung des Lysins nicht ohne Weiteres zu benutzen. Wenn jedoch die Zersetzung des Lysins mit Schwefelsäure und oxydirenden Mitteln bei Anwesenheit einer hinreichenden Menge Phosphorwolframsäure ausgeführt wird, so stimmen die gefundenen Stickstoffwerthe mit den berechneten überein.

Nach einem allerdings nur vereinzelt Experiment scheint es mir, als ob beim andauernden Erhitzen mit concentrirter Schwefelsäure aus dem Lysin eine flüchtige stickstoffhaltige Substanz entweicht.

Fassen wir die Resultate dieser Versuche zusammen, so ergibt sich, dass in den oben angeführten Präparaten stets ein und dasselbe Lysin enthalten ist¹⁾.

Den geringen Unterschieden, die sich bei der polarimetrischen Prüfung der Lysinpräparate ergeben haben, darf

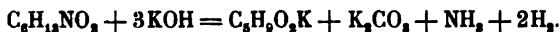
¹⁾ Selbstverständlich ist die Existenz isomerer Lysine damit keineswegs ausgeschlossen.

man um so weniger Bedeutung beilegen, da der bei der Darstellung benutzte Baryt das Drehungsvermögen beeinflussen kann. Siegfried¹⁾ hat festgestellt und Lawrow bestätigt²⁾, dass das Lysin unter der Einwirkung des Baryts in der Wärme langsam inactiv wird.

II. Ueber die Einwirkung schmelzenden Kalis auf Lysin.

Bekanntlich hat Drechsel³⁾ das Lysin als eine α, ϵ -Amidonormalcapronsäure aufgefasst. Dieser Anschauung entsprechend suchte er es durch trockne Destillation in Pentamethylen-diamin und Kohlensäure zu spalten. Diese Versuche schlugen jedoch fehl und erst in jüngster Zeit ist es Ellinger geglückt, das Lysin durch Bakterienwirkung in Pentamethylen-diamin überzuführen.⁴⁾ Auch wenn man diese Zerlegung als eine glatte Spaltung auffasst, bleibt noch die Frage zu entscheiden, welche Stelle die Carboxylgruppe einnimmt. Hier ist nur eine Stellung, nämlich diejenige im centralen Kohlenstoffatom, welche dem Lysin eine symmetrische Formel geben würde, ausgeschlossen, denn diese würde mit der optischen Activität dieser Base kaum zu vereinigen sein.

Auf Veranlassung des Herrn Professor Dr. A. Kossel habe ich die Einwirkung des schmelzenden Kalis auf Lysin untersucht. Wie Liebig erwiesen hat, erfolgt die Zersetzung des Leucins durch schmelzendes Kali unter Bildung von Valeriansäure, Ammoniak und Kohlensäure nach folgendem Schema:



Geht man von der Ansicht aus, dass das Lysin eine dem Leucin analoge Constitution besitzt, so könnte man unter gleichem Verhältnisse hier Glutarsäure als Hauptprodukt der Einwirkung erwarten.

¹⁾ Siegfried, Archiv f. Physiologie von E. du Bois-Reymond 1891, S. 270.

²⁾ Lawrow, l. c.

³⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XXV, S. 3502.

⁴⁾ Berichte der d. chem. Gesellsch., Bd. XXXII, S. 3542.

Vorläufige Versuche mit Leucin überzeugten mich davon, dass die Valeriansäure, die durch schmelzendes Kali aus dieser Amidosäure erzeugt wird, leicht nachweisbar ist. Als ich zum Beispiel bei dem ersten Versuch Leucin mit dem fünffachen Gewicht Aetzkali und wenig Wasser im Liebermann'schen Nickeltiegel zwei Stunden auf 240° erhitzt hatte (bis zum Aufhören der Ammoniakentwicklung), konnte ich aus der in Wasser gelösten und mit Schwefelsäure angesäuerten Schmelze eine organische Säure abdestilliren, deren Silbersalz 51,85% Ag enthielt, für valeriansaures Silber ist berechnet: 51,67% Ag. Ein bemerkenswerthes Resultat ergab ein zweiter Versuch, bei welchem ich 9 g reines Leucin in gleicher Weise mit Kali schmolz. Hier wurde ebenso wie beim ersten Versuch die durch Kaliwirkung gebildete flüchtige Säure übergetrieben, das Destillat mit Natronlauge genau neutralisirt, auf ein geringes Volumen eingedampft und mit Silbernitrat gefällt. Das Silbersalz wurde durch fractionirte Krystallisation in zwei Portionen verschiedener Löslichkeit zerlegt und in beiden der Silbergehalt festgestellt. Das Ergebniss war folgendes:

1. Schwerer löslicher Theil enthielt: 51,27% Ag.
 2. Leichter löslicher Theil enthielt: 61,00% Ag.
- Berechnet für $C_6H_5O_2$ Ag: 51,67% Ag.
 „ „ $C_7H_5O_2$ Ag: 59,67% Ag.
 „ „ $C_8H_5O_2$ Ag: 64,67% Ag.

Aus diesem Versuch ergibt sich, dass bei der Einwirkung schmelzenden Kalis auf Leucin neben der Valeriansäure noch gewisse Mengen niederer Fettsäure gebildet werden. Da ich in dem Extract der nicht flüchtigen Stoffe eine ätherlösliche Säure nachweisen konnte, welche sich wie Oxalsäure verhielt, so kann man vermuthen, dass hier auch Ameisensäure als Durchgangsprodukt gebildet wird.

Das für die folgenden Versuche benutzte Lysin war eine Mischung der im ersten Theil dieser Arbeit erwähnten Präparate. Es wurden 4 Versuche angestellt, bei denen das Lysin mit dem zehnfachen Gewicht Kalihydrat und wenig Wasser im Nickeltiegel erhitzt wurde und zwar in den beiden ersten Versuchen auf dem Oelbade, bei den letzten direkt über kleiner

Flamme. Es erwies sich als nothwendig, die schmelzende Masse fortwährend umzurühren, um das Schäumen und eine zu hohe Temperatursteigerung zu verhindern. Die Entwicklung von Ammoniak begann bei 280°, eine andere flüchtige Base konnte nicht nachgewiesen werden. Bei einem Versuch wurde ein Theil der alkalischen Dämpfe durch Salzsäure hindurchgesaugt, die durch Titration und Wägung des Rückstandes von Ammoniumchlorid ermittelten Zahlen stimmten mit den Zahlen des Ammoniaks überein. Unter 280° konnte die Bildung flüchtiger oder nicht flüchtiger Säuren nicht beobachtet werden.

Nach dem Abkühlen der Schmelze wurde die Reactionsmasse, wie oben beschrieben, aus saurer Lösung mit Wasserdämpfen destillirt, bis die letzte Spur flüchtiger Säure übergegangen war. Die Extraction des nicht flüchtigen Rückstandes mit Aether und der eingedampften Masse mit Alkohol ergab nur beim Versuch 4 die Gegenwart einer Menge einer Säure, die die Reactionen der Oxalsäure zeigte. Die Menge war für die Analyse zu gering. Das Destillat wurde mit n/10 Natronlauge titirt, die Resultate dieser Titirung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt, in welcher das Verhältniss

1 Molekül Lysin
2 Aequival. fl. Säure = 1 gesetzt worden ist.

Versuchs- Nummer	Angewandte Menge des Lysinchlorids	Temperatur der Schmelze	Dauer der Schmelze	Verhältniss der gefundenen zur berechneten Menge der flüchtigen Säure
1	3 g	280°	5 Stunden	0,15
2	3 g	300°	30 Min.	0,23
3	3 g	300°	40 Min.	0,93
4	4 g	300°	45 Min.	0,96

Somit waren bei den letzten beiden Versuchen auf ein Molekül Lysin 2 Aequivalente flüchtiger Säure gebildet worden, bei den ersten beiden Versuchen war die Reaction unvollständig. Auch war bei den ersten Versuchen während der Destillation ein schwacher Geruch nach Buttersäure oder Valeriansäure bemerkbar, bei der Destillation der beiden letzten

Versuche trat der Geruch nach Essigsäure oder Propionsäure auf.

Schon die gefundenen Säurezahlen drängen zu der Annahme, dass Propionsäure oder Essigsäure entstanden ist, und dies wird durch die Analyse der Silbersalze der flüchtigen Säuren bestätigt. Dieselbe wurden aus jedem Versuch in mehreren Fractionen gewonnen.

Versuchs- Nummer	Fraction	Kohlenstoff in Procenten	Wasserstoff in Procenten	Silber in Procenten
1	a	14,91	1,99	63,21
	b	15,09	2,03	63,46
2	a	16,23	2,20	62,50
	b	16,22	2,25	62,02
3	a 1)	—	—	63,77
	a 2)	—	—	63,81
	a 3)	—	—	64,23
	b	15,06	1,96	62,73
4	a 1)	—	—	63,92
	a 2)	—	—	64,07
	b	15,31	2,04	64,03

Berechnet für	Kohlenstoff	Wasserstoff	Silber
Silberacetat	14,37	1,80	64,67
Silberpropionat	19,89	2,76	59,67

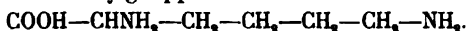
Diese Resultate zeigen, dass hier Essigsäure vorliegt, der eine geringe Menge einer höheren Säure beigemischt ist. Meine zahlreichen Versuche, eine vollkommenere Trennung dieser beiden Säuren herbeizuführen, hatten keinen Erfolg. Diese Trennung wäre jedenfalls gelungen, wenn die der Essigsäure beigemischte Säure Buttersäure oder Valeriansäure gewesen wäre.

Vergebens versuchte ich die auf Grund von Linnemann's¹⁾ Angaben von Haberland²⁾ ausgearbeitete Methode zur Trennung von Essigsäure und Propionsäure anzuwenden. Ich hatte bei den Reaktionsprodukten der Kalischmelze aus Lysin ebensowenig Erfolg, wie bei künstlichen Gemischen von Essigsäure und Propionsäure, die ich mir bereitete und die ich genau nach den Vorschriften Haberland's verarbeitete.

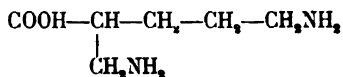
Somit ergab sich, dass an Stelle der erwarteten Glutarsäure ein Gemisch von Essigsäure und Propionsäure aufgetreten war. Eine Erklärung für dies Verhalten fand sich erst, als die Glutarsäure selbst 30 Minuten bei 280—300° mit Kali geschmolzen und die Schmelze auf flüchtige Säuren verarbeitet wurde. Hierbei entstanden dieselben Säuren, welche ich aus dem Lysin erhalten hatte, in reichlichen Mengen. Die Analyse der aus Glutarsäure dargestellten Silbersalze ergab:

1. Fraction: 63,4 % Ag,
2. Fraction: 63,4 % Ag,
3. Fraction: 63,5 % Ag.

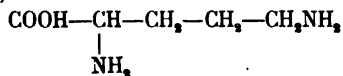
Meine Versuche stimmen somit völlig mit der Auffassung des Lysins als einer α, ϵ -Amidocaprönsäure überein. Die Stellung der Carboxylgruppe ist also wahrscheinlich folgende:



Die Stellung



ist unwahrscheinlich, da sich in diesem Falle vermuthlich das Lysin der Wirkung schmelzenden Kalis gegenüber ebenso verhalten würde, wie die Diamidovaleriansäure



welche aus Arginin³⁾ hervorgeht. Einige Versuche belehrten

1) Linnemann, Annalen der Chemie, Bd. 160, S. 223.

2) K. R. Haberland, Zeitschrift für analytische Chemie 1899, S. 217. Diese Methode beruht auf der verschiedenen Löslichkeit der basischen Bleisalze in siedendem Wasser.

3) Schulze u. Winterstein; Berichte der deutsch. chem. Ges. 32, S. 3191 und diese Zeitschr. Bd. XXVI, S. 1.

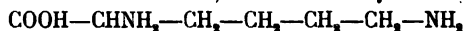
mich aber darüber, dass das Arginin durch schmelzendes Kali nicht in gleicher Weise zerlegt wird, wie Lysin.

6 g Argininchlorid wurden zunächst mit 60 g Kali im Oelbade eine Stunde auf 200° erhitzt. Die Destillation, in gleicher Weise wie beim Lysin ausgeführt, gab nur eine geringe Menge flüchtiger Säure (0,2 g Silbersalz). Bei der Destillation war starker Buttersäuregeruch bemerkbar. Das Silbersalz gab bei der Analyse: 56,89% Ag, berechnet für Silberbutyrat: 55,38% Ag. Im nicht flüchtigen Antheil waren keine ätherlöslichen Stoffe nachweisbar. Nach Ausfällung der Schwefelsäure mit Baryt wurde der Rückstand eingedampft und von Neuem mit Kali bei 300° geschmolzen, bis die bei 280° beginnende Ammoniakentwicklung beendet war ($\frac{3}{4}$ Stunde). Die Schmelze wurde angesäuert und destillirt, wobei kein Buttersäuregeruch bemerkbar war, der nicht flüchtige Theil gab keine Stoffe aus wässriger Lösung an Aether ab. Die Analyse der aus den flüchtigen Säuren dargestellten Silbersalze gab folgende Zahlen:

	C	H	Ag
Gefunden:	15,21	2,13	63,38
Berechnet für Silberacetat:	14,37	1,80	64,67
„ „ Silberpropionat	19,89	2,76	59,67.

Während die Zusammensetzung des aus Arginin gewonnenen Salzes hiernach die gleiche war, war die quantitative Ausbeute doch eine durchaus andere. Dieselbe war eine derartige, dass man auf 1 Molekül Arginin die Bildung von 1 Molekül flüchtiger Säure anzunehmen hat. Setzt man dies berechnete Verhältniss $\frac{1 \text{ Molekül Arginin}}{1 \text{ Aequivalent fl. Säure}}$ gleich 1, so betrug das gefundene 0,90.

Diese Ergebnisse schliessen zwar die zweite der in Erwägung gezogenen Formeln nicht mit Sicherheit aus, machen es aber höchstwahrscheinlich, dass dem Lysin die Constitution



zukommt.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. A. Kossel für sein vielfaches Interesse und seine Unterstützung bei meinen Arbeiten in seinem Laboratorium meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Einige Bemerkungen über das Arginin.

Von

E. Schulze.

(Der Redaction zugegangen am 18. März 1900.)

Ob die Arginin-Präparate verschiedener Herkunft gleiche Eigenschaften besitzen oder nicht, das ist eine Frage, die der Prüfung bedarf. Mit dieser Prüfung hat W. Gulewitsch¹⁾ sich beschäftigt; er verglich «thierisches Arginin», dargestellt aus Heringssperma, mit dem von mir und meinen Mitarbeitern untersuchten «pflanzlichen Arginin» und glaubte dabei eine sehr grosse Verschiedenheit der beiden Substanzen im specifischen Drehungsvermögen gefunden zu haben. Doch beruhte letzteres auf einem Missverständniss, wie aus dem Nachtrag zu ersehen ist, den W. Gulewitsch²⁾ seiner Abhandlung folgen liess; denn die in der bezüglichen Mittheilung von E. Steiger und mir angegebenen Zahlen bedeuten nicht, wie Gulewitsch glaubte, Kreisgrade,³⁾ sondern Grade der Scala

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 178.

2) Ebendasselbst, S. 368.

3) Dass unsere Angaben missverstanden worden sind, hat mich sehr überrascht. Nach meiner Ansicht ist doch leicht zu sehen, dass E. Steiger und ich in den Sätzen: «Eine wässrige Lösung, welche in 20 ccm. 2,0 g Argininnitrat enthielt, drehte im Soleil-Ventzke'schen Polarisationsapparat im 200 mm.-Rohr 5,75° nach rechts» und «Eine wässrige Lösung, welche in 50 ccm. 4,0 g salzsaures Arginin enthielt, drehte im Soleil-Ventzke'schen Polarisationsapparat im 200 mm.-Rohr 5,3° nach rechts» die bei der Untersuchung jener Salze im genannten Apparat unmittelbar erhaltenen Ergebnisse mittheilen. Es würde doch seltsam sein und nicht dem Usus entsprechen, wenn wir die im Soleil-Ventzke'schen Apparat gemachten Beobachtungen nicht in Graden der diesem Apparat eigenthümlichen Scala, sondern in Kreisgraden an-

des Soleil-Ventzke'schen Apparates. Aus diesen Zahlen berechnen sich für Argininnitrat $[\alpha]D = +9,95$, für Argininchlorid $[\alpha]D = +11,45$ — Werthe, welche von den von Gulewitsch gefundenen Zahlen ($[\alpha]D = +9,31$ für Argininnitrat und $= +10,70$ für Argininchlorid) nur wenig abweichen. Ich kann hinzusetzen, dass die Differenzen innerhalb der Fehlergrenze unserer Bestimmungen liegen; denn der damals von uns verwendete Apparat gestattete nicht, bei Ermittlung des Drehungsvermögens der zur Untersuchung gelangenden Substanzen eine grössere Genauigkeit zu erreichen.

Die bei der Untersuchung im Polarisationsapparat erhaltenen Resultate geben also, wie auch Gulewitsch meint, keine Veranlassung, das thierische Arginin für verschieden vom pflanzlichen zu erklären; ebensowenig führten zu einer solchen Annahme die übrigen Resultate, zu denen Gulewitsch in seiner Arbeit gelangte. Denn die Beobachtungen, welche dieser Forscher über die Eigenschaften und über die Zusammensetzung des Argininchlorids, des Argininnitrats und des Argininkupfernitrats machte, sind fast in allen Stücken Bestätigungen der bezüglichen Angaben von E. Steiger und mir; nur in wenigen Punkten sind kleine Abweichungen hervorgetreten. Auf diese Abweichungen will ich im Folgenden näher eingehen.

Was zunächst das Argininchlorid betrifft, so hatte Gulewitsch ein Präparat dieses Salzes unter Händen, in welchem ein Molekül Krystallwasser gefunden wurde,¹⁾ während das von E. Steiger und mir untersuchte Präparat wasserfrei

gegeben hätten, ohne in letzterem Falle zu erwähnen, dass die Kreisgrade durch Berechnung aus den an der Scala des genannten Apparates abgelesenen Werthen erhalten wurden. Uebrigens hätte schon ein Blick in irgend eine andere meiner Abhandlungen, in welcher Angaben über das specifische Drehungsvermögen irgend welcher Substanzen sich finden, zeigen können, wie die obigen Sätze zu verstehen sind; denn ich habe dort stets die Ergebnisse der polarimetrischen Bestimmungen in analoger Weise mitgetheilt, jedoch unter Hinzufügung der für $[\alpha]D$ berechneten Werthe.

¹⁾ Das Gleiche gilt für ein von S. G. Hedin untersuchtes Präparat des gleichen Salzes; dieses Präparat verlor das Krystallwasser schon bei 100°.

war. Doch waren diese beiden Präparate nicht genau in der gleichen Weise dargestellt; das unsrige war nämlich aus Wasser, das von Gulewitsch untersuchte dagegen aus verdünntem Weingeist umkrystallisirt worden. Da von E. Steiger und mir mehrere Analysen des Argininchlorids ausgeführt worden sind, so war es sehr unwahrscheinlich, dass unsere Angabe über das Fehlen von Krystallwasser in diesem Salz auf einem Irrthum beruhte; um indessen völlig sicher zu sein, habe ich ein von früher her in meinen Händen befindliches Präparat des Chlorids noch einmal untersucht. Dabei ergab sich, dass das Salz beim Erhitzen auf 130—135° im Luftbade nicht an Gewicht verlor.

Das Argininchlorid vermag also sowohl mit als ohne Krystallwasser zu krystallisiren.

Ferner erhielt Gulewitsch bei Bestimmung des Krystallwassers im Argininkupfernitrat Zahlen, welche der Formel $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3\frac{1}{2}H_2O$ entsprechen, während sowohl von E. Steiger und mir als von S. G. Hedin für die genannte Verbindung eine Formel mit drei Molekülen Krystallwasser angenommen worden ist. Ich bemerke dazu, dass von meinen Mitarbeitern und mir mehr als 10 Präparate von Argininkupfernitrat verschiedener Herkunft untersucht worden sind und dass die dabei erhaltenen Resultate sämmtlich zu einer Formel mit 3 Molekülen Krystallwasser führen. Der letzteren Formel entsprechen auch die bei Bestimmung des Kupfergehalts jener Präparate gefundenen Zahlen besser, als einer Formel mit $3\frac{1}{2}$ Molekülen Krystallwasser. Allerdings übersteigen die bei der Krystallwasserbestimmung von uns erhaltenen Resultate zum Theil nicht ganz unbeträchtlich die Werthe, welche aus der von uns gegebenen Formel sich berechnen, wie schon aus der ersten, von E. Steiger und mir über das Arginin gemachten Mittheilung zu ersehen ist;¹⁾ doch ist das Plus nicht so gross, dass es zur Aufstellung einer Formel mit $3\frac{1}{2}$ Molekülen Krystallwasser führen könnte.

¹⁾ Statt der berechneten 9,16% fanden wir 9,37—9,54% Krystallwasser.

Die kleine Abweichung, welche in Bezug auf diesen Punkt zwischen unseren Angaben und den Angaben von Gulewitsch hervorgetreten ist, würde sich erklären, wenn man annimmt, dass das Argininkupfernitrat schon beim Liegen an der Luft oder im Exsiccator über Chlorcalcium einen kleinen Theil seines Krystallwassers verlieren kann. Für die Identität des von Gulewitsch und des von uns untersuchten Argininkupfernitrats spricht übrigens noch die Thatsache, dass die über den Schmelzpunkt unserer Präparate gemachten Beobachtungen der von Gulewitsch gemachten Angabe (112—114°) entsprechen.

Wie aus den im Vorigen gemachten Mittheilungen zu ersehen ist, liegt kein Grund vor, eine Verschiedenheit des thierischen und des pflanzlichen Arginins anzunehmen. Man kann nun noch die Frage aufwerfen, ob das im pflanzlichen Stoffwechsel entstandene Arginin in seinen Eigenschaften vollständig mit dem beim Kochen der Eiweissstoffe mit Säuren sich bildenden Arginin übereinstimmt. In Beantwortung dieser Frage ist auf eine kleine Verschiedenheit aufmerksam zu machen, welche zwischen den Arginin-Präparaten, die jenen beiden Quellen entstammen, hervorgetreten ist. Aus den Pflanzen-Säften und -Extracten kann man, wie von mir an mehreren Objecten gezeigt worden ist, Arginin durch Mercurinitrat ausfällen¹⁾; auch das bei Zerlegung dieser Niederschläge resultirende Argininnitrat gibt in wässriger Lösung mit Mercurinitrat eine Fällung. Isolirt man das Arginin aus den Pflanzen-extracten mit Hülfe von Phosphorwolframsäure und führt das bei Zerlegung des bezüglichen Niederschlags erhaltene Arginin in das Nitrat über, so resultiren gleichfalls Präparate, die mit Mercurinitrat einen Niederschlag geben; sie behalten diese Eigenschaft auch, wenn man sie durch Ueberführung in die schwerlösliche Kupferverbindung einer Reinigung unterworfen hat. Das Nitrat des durch Spaltung von Eiweissstoffen mit Säuren erhaltenen Arginins gibt dagegen unter gleichen Umständen mit Mercurinitrat keine Fällung. Andere Verschieden-

1) Doch ist die Ausfällung keine vollständige.

heiten zwischen den aus Eiweissstoffen und den aus Keimpflanzen dargestellten Argininpräparaten haben wir aber bis jetzt nicht auffinden können. Auch geht aus den von E. Winterstein und mir ausgeführten Versuchen hervor, dass Arginin, mag es nun der einen oder der anderen Quelle entstammen, beim Erhitzen mit Barytwasser Ornithin und Harnstoff als Zersetzungsprodukte liefert.

Man kann es wohl nicht für ganz unwahrscheinlich erklären, dass dem aus Keimpflanzen dargestellten Arginin seine Eigenschaft, durch Mercurinitrat gefällt zu werden, durch eine nur in sehr geringer Menge vorhandene Verunreinigung gegeben wird. Allerdings gaben die jener Quelle entstammenden Argininnitrat-Präparate auch dann, wenn sie möglichst gut gereinigt worden waren, noch Fällung mit Mercurinitrat; doch schienen die Niederschläge allmählich schwächer zu werden. Vielleicht gelingt es noch, eine Reinigungsmethode aufzufinden, durch welche man den Argininnitrat-Präparaten die Eigenschaft, durch Mercurinitrat gefällt zu werden, nehmen kann. Uebrigens wird die Darstellung von Arginin aus Pflanzenextracten durch sein Verhalten gegen Mercurinitrat in vielen Fällen erleichtert. Doch geht in den Mercurinitrat-Niederschlag nach den mit *Lupinus*-Keimpflanzen von uns gemachten Versuchen neben Arginin auch Histidin ein.

Im Hinblick auf die vor Kurzem erschienene Abhandlung Thompson's¹⁾ über die physiologische Wirksamkeit der Protamine und ihrer Spaltungsprodukte sei hier noch daran erinnert, dass auch nach Versuchen, welche früher schon von Schmiedeberg ausgeführt wurden,²⁾ das Arginin im Thierkörper keine giftige Wirkung hervorbringt.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 1.

2) Berichte der d. chem. Gesellsch., Bd. XXIX, S. 355.

Die Constitution des Ornithins und des Lysins. Zugleich ein Beitrag zur Chemie der Eiweissfäulniss.*)

Von

Dr. phil. et med. **Alexander Ellinger**,
Privatdocent und Assistent des Instituts.

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medicinische Chemie in Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 18. März 1900.)

Seitdem Drechsel¹⁾ die Entdeckung gemacht hat, dass bei der hydrolytischen Spaltung von Eiweisskörpern nicht nur die bekannten Monoamidosäuren als Zersetzungsprodukte auftreten, sondern auch Substanzen von ausgesprochen basischem Charakter, sind diese Basen ein bevorzugtes Gebiet der physiologisch-chemischen Forschung geworden. Durch wesentliche Vervollkommnung der Methodik, welche wir vorzugsweise Hedin²⁾ und A. Kossel³⁾ verdanken, gelang es, in allen daraufhin untersuchten Eiweisskörpern die drei basischen Spaltungsprodukte Histidin, Arginin und Lysin aufzufinden und diese drei Substanzen als wesentliche Zerfallsprodukte der Protamine, welche Kossel als die einfachsten Eiweisskörper anspricht, nachzuweisen. Nach diesen Befunden fand auch die Entstehung des Arginins in Lupinen- und Kürbiskeimlingen,

*) Eine kurze Veröffentlichung über die hauptsächlichsten Resultate dieser Arbeit ist bereits in den Berichten der chemischen Gesellschaft 31, 3183 und 32, 3542 erschienen.

1) Ber. d. math.-phys. Klasse der Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wiss. 1892 S. 116.

2) Diese Ztschr. Bd. XXI, S. 155.

3) Diese Ztschr. Bd. XXV, S. 165.

worin es von E. Schulze und Steiger¹⁾ entdeckt worden war, seine Erklärung.

Von den drei genannten Basen ist die Molekularformel durch zahlreiche Analysen wohl krystallisirender Salze, theilweise auch durch Molekulargewichtbestimmungen festgestellt; aber allein beim Arginin ist es bisher gelungen, durch Spaltungsreactionen einen Einblick in die Constitution zu erlangen. Schulze und Winterstein²⁾ nämlich fanden, dass das Arginin beim Erhitzen mit Barytwasser in Harnstoff und Ornithin zerfällt. Sie sprachen daraufhin das Arginin als ein Guanidin-derivat, ähnlich dem Kreatin an, in welchem eine Amidogruppe durch den Ornithinrest ersetzt ist. In neuester Zeit ist den beiden Forschern³⁾ auch die Bestätigung ihrer Anschauung auf synthetischem Wege geglückt. Sie erhielten, analog der Kreatinsynthese aus Cyanamid und Methylglycocol, das Arginin aus Cyanamid und Ornithin. Die interessanten Befunde von Schulze und Winterstein, dass das Ornithin ein Spaltungsprodukt aller Eiweisskörper sei, legten diesem Körper wieder ein erhöhtes Interesse bei.

Das Ornithin ist bekanntlich von Jaffé⁴⁾ aus der Ornithursäure durch Spaltung mit Salzsäure in Form seines salzsauren Salzes erhalten worden. Die Ornithursäure, das Dibenzoyl-derivat des Ornithins, wurde im Harn von Hühnern nach Fütterung mit Benzoësäure aufgefunden.

Auf Grund der Analyse einer Reihe von Salzen sprach Jaffé das Ornithin als eine Diamidovaleriansäure an. Diamidosäuren der Fettreihe waren damals weder synthetisch dargestellt noch im Thier- oder Pflanzenkörper aufgefunden. Erst 15 Jahre nach der Entdeckung des Ornithins wurde eine Substanz gefunden, die nach ihren Reactionen wie nach ihrer Formel als eine dem Ornithin homologe Verbindung erschien, das Lysin Drechsels. Zwei Jahre darauf wurde zum ersten

1) Diese Ztschr. Bd. XI, S. 43.

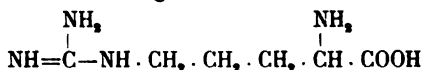
2) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30. 2879 u. diese Ztschr. Bd. XXVI, S. 1.

3) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 3191.

4) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 10, 1925 u. 11, 406.

Male eine Diamidosäure der Fettreihe synthetisch erhalten. Klebs¹⁾ stellte in Hüfner's Laboratorium aus α - β -Dibrompropionsäure die entsprechende Diamidopropionsäure dar. Sie zeigte sowohl mit dem Ornithin wie mit dem Lysin die grösste Aehnlichkeit in ihrem chemischen Verhalten, so dass die Anschauungen Jaffé's und Drechsel's eine wesentliche Stütze erhielten. Noch aber stand der Beweis für die Richtigkeit ihrer Formeln aus und vor Allem fehlte zur vollen Erkenntniss der Constitution des Ornithins und Lysins die Beantwortung der Frage, welches die Stellung der beiden Amidogruppen sei.

Zwar haben Schulze und Winterstein in der oben erwähnten Arbeit dem Arginin die Constitutionsformel



beigelegt, aber sie führen in ihrer ersten Publication für die α - β -Stellung der beiden Amidogruppen keine Gründe an und in der ausführlicheren Arbeit in dieser Zeitschrift wird höchstens wahrscheinlich gemacht, dass die beiden Amidogruppen sich nicht an benachbarten Kohlenstoffatomen befinden.

Bei den ausserordentlichen Schwierigkeiten, mit welchen die Darstellung einer grösseren Menge von Ornithin verknüpft ist, versprach zur Aufklärung seiner Constitution nur eine solche Methode Erfolg, welche für den einzelnen Versuch nicht zu viel Material erforderte. Frühere Versuche, Spaltungsprodukte des Ornithins zu erhalten, die Herr Professor Jaffé, wie er mir mittheilte, angestellt hatte, hatten wegen Mangels an Material keine entscheidenden Resultate ergeben. Eigene Bemühungen, durch trocknes Erhitzen des salzsauren Ornithins etwa zu einem Pyridin- oder Pyrrolidinderivat zu gelangen, hatten aus dem gleichen Grunde bisher nicht mehr Erfolg. Auch die analogen Versuche Drechsel's²⁾ mit dem Lysin er-muthigten nicht dazu, diesen Weg weiter zu betreten. Ich versuchte deshalb nicht mit Hülfe chemischer Agentien, sondern durch die Wirkung von Fäulnissbakterien die Spaltung des Ornithins zu bewirken.

1) Diese Ztschr. Bd. XIX, S. 301.

2) Ber. d. d. chem. Ges. 25, 2454.

Die Anwendung dieser Methode versprach deshalb von vornherein Erfolg, weil Brieger¹⁾ das Putrescin, welches später durch die Untersuchungen von Ladenburg²⁾ und Baumann und v. Udranszky³⁾ als Tetramethylendiamin identificirt wurde, als Produkt von faulenden, allerdings nicht einheitlichen Eiweisssubstanzen erhalten hatte. Auf die nahen chemischen Beziehungen zwischen dem Ornithin und Putrescin hatten schon Baumann und v. Udranszky aufmerksam gemacht, ohne indessen diesen Gedanken weiter zu verfolgen. Da nun inzwischen das Ornithin als Spaltungsprodukt der Eiweisskörper nachgewiesen worden ist, so eröffnete sich ein neuer Ausblick auf die Entstehungsweise des Putrescins und zugleich die Möglichkeit, die Frage nach der Constitution des Ornithins auf dem angegebenen Wege zu entscheiden.

Es gelang in der That, durch Anwendung der Fäulnissmethode vom Ornithin zum Putrescin zu gelangen und in gleicher Weise lieferte das Lysin das homologe Cadaverin oder Pentamethylendiamin.

I. Versuche mit dem salzsauren Ornithin.

Ueber die Darstellung der Ornithursäure aus Hühnerexcrementen füge ich der Beschreibung in der Arbeit von Jaffé einige Erfahrungen hinzu, die im Laufe der Jahre bei der Gewinnung jener Substanz im hiesigen Institute gesammelt worden sind.

Es empfiehlt sich, den Hühnern den Dickdarm oberhalb der Cloake zu unterbinden, um den Urin ohne Kothbeimengung zu erhalten. Die Ausbeuten werden dadurch wesentlich verbessert. Allerdings gehen die Versuchsthiere früher zu Grunde. Immerhin hielten einzelne Thiere die Fütterung von je 0,5 g benzoesaurem Natron 12—14 Tage lang aus; die durchschnittliche Lebensdauer betrug bei dieser Dosis 7—9 Tage. Grössere Dosen anzuwenden, ist nicht gerathen, obwohl die Thiere die-

1) Die Ptomaine. Berlin 1886.

2) Ber. d. d. chem. Ges. 16, 360.

3) Diese Ztschr. Bd. XIII, S. 562.

selben vertragen, da auch so schon beträchtliche Mengen unveränderter Benzoesäure ausgeschieden werden.

Bei der Reinigung der harzig ausgeschiedenen Ornithursäure ist besonders darauf zu achten, dass beim Uebersättigen des mit Kaliumpermanganat entfärbten Filtrats mit Salzsäure in sehr verdünnter Lösung und möglichst bei niederer Temperatur gearbeitet wird. Nur dann geht die harzige Masse, die meist bald hart und spröde wird, auch in kurzer Zeit in den krystallinischen Zustand über. Bis die letzten Antheile des Harzes krystallinisch geworden sind, vergehen oft mehrere Wochen.

Was die Ausbeuten anlangt, so wurden in einem Falle aus den Excrementen eines Huhnes mit unterbundenem Darm nach Verabreichung von 4 g benzoesaurem Natron in Dosen von 0,5 g erhalten: aus der ätherischen Lösung 0,17 g, aus der wässerigen Lösung als Harz 0,95 g (nach Abpressen mit Fliesspapier und Trocknen an der Luft gewogen). An reiner krystallinischer Substanz erhält man etwa die Hälfte von dem Gewicht des Harzes.

Nach einer mehrwöchentlichen Fütterung einer grösseren Zahl von Hühnern mit 205 g benzoesaurem Natron wurden im Ganzen ca. 33 g reine Ornithursäure erhalten.

Aus der krystallinischen Ornithursäure wurde durch Kochen mit concentrirter Salzsäure am Rückflusskühler nach der Vorschrift Jaffe's das salzsaure Ornithin dargestellt. Wenn der syrupöse Rückstand nach mehrmaligem Abdampfen der überschüssigen Salzsäure beim Versetzen mit kaltem absoluten Alkohol nicht ohne Weiteres krystallinisch erstarrt, so gelingt es oft, durch Zusatz weniger Tropfen verdünnten Ammoniaks die Krystallisation zu bewirken.

Zu den Fäulnisversuchen wurde manchmal nicht das krystallisirte Salz benutzt, sondern der nach Verjagen der überschüssigen Salzsäure zurückbleibende Syrup.

Bei den ersten Fäulnisversuchen war die Versuchsanordnung die folgende: Das salzsaure Salz wurde in etwa der hundertfachen Menge Leitungswasser gelöst, mit wenigen Tropfen Sodalösung schwach alkalisch gemacht und mit

2—3 Flocken eines faulenden Pankreas und einigen Tropfen Faulflüssigkeit versetzt. Am wirksamsten erwiesen sich die Fäulnisbakterien, wenn das in Stücke zerhackte Pankreas unter ganz schwacher Sodalösung in einem mit Wattebausch verschlossenen geräumigen Kolben an einem mässig warmen Orte etwa 24 Stunden gestanden hatte. Die oben beschriebene Lösung wurde in einem offenen oder mit Wattebausch verschlossenen Kolben im Brutschrank 3 Tage lang bei ca. 30° stehen gelassen. Sie wurde nach Ablauf dieser Frist mit Essigsäure schwach angesäuert, zum Sieden erhitzt, damit die geringen Quantitäten noch vorhandenen Eiweisses coaguliert würden, und filtrirt. Das Filtrat wurde so lange mit Benzoylchlorid und Natronlauge nach der Baumann-Schotten'schen Methode geschüttelt, bis ein neuer Zusatz von Benzoylchlorid keine neue Ausscheidung mehr bewirkte. Es bildete sich eine unlösliche Benzoylverbindung, die sich zunächst schmierig abschied, aber meist schon nach mehrstündigem Stehen ohne Weiteres krystallinisch wurde. Die ausgeschiedene Verbindung wurde abfiltrirt, in heissem Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung in etwa die 20fache Menge kalten Wassers gegossen, worauf sie sich in schönen Nadeln und Blättchen abschied, welche schon nach einmaligem Umkrystallisiren aus Alkohol den Schmelzpunkt 176° zeigten. Bei mehrmaligem Umkrystallisiren stieg der Schmelzpunkt auf 178°. In der Literatur finden sich für den Schmelzpunkt des Dibenzoyltetramethylendiamins von verschiedenen Beobachtern beide Angaben.

Die Elementaranalyse ergab für diesen Körper stimmende Zahlen:

I. 0,2035 g Substanz gaben im offenen Rohr verbrannt 0,5474 g CO_2 = 73,36% C und 0,1256 g H_2O = 6,88% H.

II. 0,2229 g Substanz gaben nach Dumas 18,6 ccm. N bei 15° und 762 mm. Druck = 9,80% N.

$\text{C}_8\text{H}_8(\text{NH} \cdot \text{COC}_6\text{H}_5)_2$ Berechnet: C 72,97 H 6,75 N 9,46

Gefunden: C 73,36 H 6,88 N 9,80.

Um die Dibenzoylverbindung vollständig aus der Lösung zu gewinnen, wurde das alkalische Filtrat angesäuert. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde abfiltrirt, die saure Lösung

noch mehrmals ausgeäthert, der Aether fast vollständig abdestillirt und der Rest der ätherischen Lösung in Natronlauge eingetragen. Diese weitere Behandlung, welche Baumann gelegentlich der Isolirung der Diamine aus dem Harn bei Cystinurie empfohlen hat, erwies sich in dem vorliegenden Falle als überflüssig; denn die nachträgliche Ausscheidung der Benzoylverbindung war minimal. Der aus der angesäuerten Lösung nach längerem Stehen ausgeschiedene Niederschlag wurde mehrmals mit Petroläther ausgekocht und heiss filtrirt. Aus dem Rückstande konnte durch Umkrystallisiren aus Alkohol unveränderte reine Ornithursäure gewonnen werden.

Bei einem Versuche wurde ein Theil der Lösung nach dem Faulen nach der Methode Brieger's behandelt, welche er zur Isolirung seiner Ptomaine benutzte. Das Fäulnissprodukt wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand mehrfach mit absolutem Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wurde mit alkoholischem Quecksilberchlorid versetzt. Dabei schied sich ein reichlicher Niederschlag aus, welcher abfiltrirt und in wenig Wasser gelöst wurde. Die Lösung wurde mittelst Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, filtrirt und zur Trockne verdampft. Der krystallinische Rückstand wurde mit wenig 96%igem Alkohol warm extrahirt und der in Alkohol unlösliche Theil in wenig Wasser gelöst und unter Zusatz von Alkohol mit wässerigem Platinchlorid gefällt.

Das so erhaltene Platinsalz stimmte in seinen Eigenschaften mit denjenigen des Putrescin-Platinchlorids überein. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,0820 g Substanz lieferten 0,0320 g Pt = 39,03%.

$C_4H_9(NH_2, HCl)_2 \cdot PtCl_4$ Berechnet: Pt 39,15%. Gefunden: 39,03%.

Bei den nach der beschriebenen Methode — unter Luftzutritt — angestellten Fäulnissversuchen war die Ausbeute in allen Fällen gering. Mehr als etwa 12% der theoretischen Menge wurden nie erhalten, in einigen Fällen überhaupt nur Spuren der Benzoylverbindung isolirt. Durch Kontrollversuche wurde ermittelt, dass aus den minimalen Mengen des zugesetzten Pankreas oder der Faulflüssigkeit das gefundene

Dibenzoylputrescin nicht stammen konnte. Solche Proben ergaben, in der gleichen Weise behandelt, nur eine schwache milchige Trübung, aus welcher sich nach mehrtägigem Stehen in der Kälte manchmal ganz wenige Krystalle abschieden. Nur in einem Versuche war es möglich, ihren Schmelzpunkt zu bestimmen. Derselbe lag nahe dem des Dibenzoylcadaverins. Ob diese Substanz vorlag, liess sich der sehr geringen Menge halber nicht bestimmen. Nach den in der Litteratur vorliegenden Angaben von Garcia¹⁾ und Werigo²⁾ ist es nicht unwahrscheinlich.

Wesentlich besser wurden die Ausbeuten an Putrescin, wenn bei der Fäulniss der Luftzutritt gänzlich ausgeschlossen wurde. Die Versuchsanordnung, welche bei den späteren Versuchen stets angewandt wurde, war die folgende: das salzsaure Salz wurde in etwa der hundertfachen Menge ausgekochten Leitungswassers gelöst, welchem geringe Mengen von Chlorkalium, Magnesiumsulfat und Natriumphosphat zugesetzt waren, und mit Sodalösung schwach alkalisch gemacht. Die Lösung wurde wie in den früheren Versuchen mit Pankreasflocken und Faulflüssigkeit versetzt und in ein mit doppelt durchbohrtem Kautschukstopfen verschlossenes Kölbchen gebracht, welches sie fast ganz anfüllte. Durch die eine Oeffnung des Stopfens führte ein dünnes Gaszuleitungsrohr bis auf den Boden des Kölbchens; dieses Rohr trug oben ein Stück Gummischlauch, welches durch einen Quetschhahn verschlossen werden konnte. Durch die andere Oeffnung ging ein Glasrohr, das dicht unter dem Stopfen endete und dessen aus dem Stopfen herausragender Theil nach unten umgebogen in Wasser endete. Ueber die unter das Wasser mündende Oeffnung konnte ein Reagenzgläschen zum Auffangen entweichender Gase umgestülpt werden. Durch den Kolben wurde vor dem Versuch mindestens eine halbe Stunde Wasserstoff geleitet. Dann wurde der Quetschhahn verschlossen und die von der Luft gänzlich abgeschlossene Flüssigkeit 3—4 Tage im Brutschrank bei 30—35° belassen. Die Verarbeitung geschah wie bei den Versuchen mit Luftzutritt.

1) Diese Zeitschr. Bd. XVII, S. 543.

2) Pflüger's Archiv. Bd. 51, S. 352.

Ein quantitativ durchgeführter Versuch mit dieser Versuchsanordnung ergab folgende Zahlenverhältnisse: Aus 0,74 g krystallinischen salzsauren Ornithins wurden etwas über 0,5 g reines krystallinisches Dibenzoylputrescin erhalten. 0,278 g Ornithursäure wurden aus der gefaulten Lösung zurückgewonnen entsprechend 0,162 g salzsaurem Ornithin ($1\frac{1}{2}$ HCl). Es waren also 0,58 g des Salzes zersetzt. Die theoretische Ausbeute an Dibenzoylputrescin berechnet sich zu 0,92 g, so dass also 50—60% der theoretischen Menge erhalten wurden.

Auch auf andere stickstoffhaltige Zersetzungsprodukte des Ornithins wurde in den gefaulten Lösungen gefahndet, insbesondere auf *D*-Amidovaleriansäure, welche unter den Fäulnisprodukten des Eiweisses gelegentlich von E. und H. Salkowski¹⁾ aufgefunden worden ist. Ausser Ammoniak konnte aber keine stickstoffhaltige Substanz isolirt werden.

II. Versuche mit salzsaurem Lysin.

Von dem salzsauren Lysin kamen eine Reihe Präparate verschiedener Herkunft und verschiedener Herstellungsweise zur Verwendung. Die ersten Versuche wurden mit Lysin angestellt, welches aus Casein gewonnen war. Ein Theil desselben wurde durch Zersetzung des vorher analysirten Platinsalzes erhalten, ein anderer nach der vortrefflichen Methode Kossel's²⁾ zunächst als pikrinsaures Salz isolirt und aus diesem in das salzsaure Salz übergeführt. Zahlreiche Fäulnisversuche mit solchem aus Casein stammenden Lysin führten zunächst nicht zu dem gewünschten Ziel. Diese ersten Versuche wurden allerdings zu einer Zeit angestellt, als ich über die besten Bedingungen der Fäulnis noch nicht viel Erfahrung hatte. Auch überzeugte ich mich dabei noch nicht durch jedesmalige Kontrolle mit Ornithinlösung, ob die zugesetzte Faulflüssigkeit im Stande war, dieses in Putrescin überzuführen, was bei den späteren Versuchen niemals unterblieb, trotzdem ich von dem werthvollen Ornithinsalz auf diese Weise viel opfern musste.

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch. Bd. XVI, S. 1191.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXVI, S. 586.

Eine solche Kontrolle halte ich aber jetzt für durchaus notwendig, so lange man nicht etwa mit Reinculturen von Bakterien arbeitet, von welchen erwiesen ist, dass sie im Stande sind, die Kohlensäureabspaltung aus den Diamidosäuren zu bewirken.

Ich schob nach den verschiedenen Fehlversuchen mit dem Lysin aus Casein die Schuld zunächst auf das Ausgangsmaterial und stellte mir, um die Frage zu entscheiden, ob nur dieses Lysin kein Pentamethyldiamin lieferte, zunächst nach Kutscher's¹⁾ Vorschrift Lysin durch Selbstverdauung von Pankreas dar. Nach den quantitativen Versuchen von Garcia²⁾ war bekannt, dass bei der Fäulniss des Pankreas reichliche Mengen von Cadaverin auftraten, deren Entstehung aus Lysin ich nach meinen Ornithinversuchen annahm.

Während ich bei einer Darstellung mich streng an die Vorschriften Kutscher's hielt und sogenanntes Trockenpankreas einer mehrmonatlichen Selbstverdauung überliess, kochte ich ein anderes Mal die frische Pankreasdrüse mit Salzsäure und Zinnchlorür nach dem Vorgange von Hlasiwetz und Habermann.³⁾ Nach meinen quantitativ durchgeführten Versuchen sind dabei die Mengenverhältnisse der entstehenden Basen ungefähr die gleichen wie bei der Selbstverdauung des Pankreas. Die Säurespaltung dürfte sich darum wegen der grossen Zeitersparniss zur Darstellung der Basen mehr empfehlen.

Ein Vergleich des Schmelzpunkts und des Drehungsvermögens der aus Casein und aus Pankreas gewonnenen Hydrochloride des Lysins zeigte, dass aus beiden Materialien dieselben Salze entstanden, und bei den späteren Fäulnissversuchen gelang es denn auch, aus beiden Cadaverin zu isoliren. In dem ersten unter Luftabschluss durchgeführten Versuch war die Ausbeute aus dem vom Pankreas stammenden Präparat grösser, in dem zweiten lieferte dieses nur geringe Mengen, während das Lysin aus Casein eine gute Ausbeute an Cadaverin gab. So grosse Mengen des Diamins wie aus Ornithin

1) Die Endprodukte der Trypsin-Verdauung, Strassburg, 1899.

2) Diese Zeitschr. Bd. XVII, S. 543.

3) Liebig's Ann. d. Chem. 169, 150.

konnte ich aus Lysin nie erhalten. Ueberhaupt scheint die Fäulniss des Lysins sich schwieriger und langsamer zu vollziehen.

Die Behandlung des gefaulten Lysins geschah nach derselben Methode, wie sie beim Ornithin beschrieben ist. Bei dem ersten erfolgreichen Versuche geschah die Isolirung nach Baumann-Schotten. Die in Alkohol gelöste, in Wasser gegossene Benzoylverbindung zeigte den Schmelzpunkt 126—128°. Die Krystalle konnten, der geringen Menge wegen, aus Alkohol nicht umkrystallisirt werden. Sie wurden vielmehr in wenig Alkohol gelöst und mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt, die trübe Flüssigkeit wurde durch Erhitzen wieder klar und beim Erkalten schieden sich wohl ausgebildete Blättchen aus, deren Schmelzpunkt zwischen 129—131° lag. Baumann gibt für das Dibenzoylpentamethylendiamin den Schmelzpunkt 130° an. Die Analyse stimmte auf diesen Körper:

0,0987 g Substanz geben nach Dumas 7,9 ccm. N bei 12° und 761 mm. Druck.

$C_8H_{10}(NHCO C_6H_5)_2$ Ber.: N 9,03%. Gef.: N 9,41%.

Bei diesem Versuche lieferten 0,477 g salzsaures Lysin 0,24 g der krystallinischen, noch nicht umkrystallisirten Dibenzoyl-Verbindung; das entspricht ca. 0,08 Cadaverin oder 36% der theoretischen Ausbeute.

In einem zweiten Versuche wurde die Lösung nach Brieger's Verfahren verarbeitet. Bei der mehrmaligen Extraction mit 96%igem und mit absolutem Alkohol blieben ansehnliche Mengen von Salmiak zurück. Die alkoholische Lösung wurde mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Aus 1,57 g salzsaurem Lysin wurden ca. 2 g des Quecksilber-Doppelsalzes erhalten, welchem nach Brieger und Bocklisch¹⁾ die Formel $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl, 4HgCl_2$ zukommt. Das entspricht 0,182 g Cadaverin oder 25% der theoretischen Ausbeute.

Das Quecksilbersalz wurde in Wasser gelöst und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrirte Lösung wurde zur Trockne eingedampft; der farblose, krystallinische Rückstand löste sich bei dreimaligem Extrahiren

¹⁾ Brieger, die Ptomaine, S. 100.

vollständig in Alkohol. Auf Zusatz von 20^o/oigem wässerigem Platinchlorid fiel sofort ein krystallinisches Platinsalz aus der alkoholischen Lösung, welches, aus wenig heissem Wasser umkrystallisirt, sich mit dem von Brieger erhaltenen Cadaverin-platinchlorid identisch erwies.

0.2043 g Substanz (bei 100^o getrocknet) lieferten 0,0772 g Platin
 $C_8H_{10}(NH_2, HCl)_2 PtCl_4$ Ber.: Pt 38.02% Gef.: Pt 38,28%.

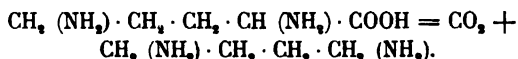
Mit alkoholischer oder wässriger Pikrinsäure gibt die alkoholische Lösung des salzsauren Salzes ein in Alkohol und Wasser schwer lösliches Pikrat vom Schmelzpunkt 221—223^o. Brieger gibt 222^o an. Auch die übrigen für das Cadaverin angegebenen Reactionen gegenüber Alkaloidreagentien wurden mit der aus Lysin gewonnenen Base erhalten, so dass an ihrer Identität mit Cadaverin kein Zweifel sein kann. Davon, dass das angewandte Lysin nicht etwa mit Cadaverin von vornherein verunreinigt war, überzeugte ich mich durch Benzoylirung nach Schotten-Baumann. Aus der alkalischen Lösung schied sich dabei keine Benzoylverbindung ab.

III. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Durch den Uebergang von Ornithin in Putrescin bei der Fäulniss ist erwiesen, dass den beiden Amidogruppen im Ornithin die α - δ -Stellung zukommt, welche für das Putrescin von Ladenburg¹⁾ durch die Gewinnung des Putrescins aus Aethylencyanid auf dem Wege der Reduction erwiesen ist. Eine Atomumlagerung anzunehmen, liegt kein Grund vor, zumal der Process relativ glatt verläuft, wie die Ausbeute von 50—60 % Putrescin unter günstigen Bedingungen beweist. Ebenso wenig ist ein Grund zu der Annahme vorhanden, dass etwa die Fäulnissbakterien das Ornithin nur als ein geeignetes Nährmaterial benutzen und das Putrescin als ein von dieser Nahrung unabhängiges Stoffwechselprodukt ausscheiden. Sonst wäre nicht einzusehen, warum sie gerade nach Ornithin-Aufnahme Putrescin, nach Lysin-Nahrung Cadaverin ausscheiden.

1) Ber. d. d. chem. Ges. 1. c.

Man kann also den Process der Putresceinbildung durch die folgende Gleichung ausdrücken:



Nicht streng erwiesen ist allerdings bisher, dass eine Amidogruppe mit dem Carboxyl an demselben Kohlenstoffatom haftet. Aber es ist gewiss die wahrscheinlichste Annahme, wenn man bedenkt, dass die Monoamidosäuren, die als Spaltungsprodukte aus Eiweisskörpern künstlich erhalten worden sind oder im Thierkörper vorkommen, fast sämmtlich diese Atomgruppierung zeigen, so das Glycocoll, Alanin, die α -Amidovaleriansäure, das Leucin und Tyrosin. Noch ein Weiteres spricht dafür: Die bereits angeführte β -Amidovaleriansäure, welche E. und H. Salkowski bei der Fäulniss von Fleisch auffanden und Gabriel¹⁾ mit seiner synthetisch erhaltenen Säure identificirte, darf wohl ebenfalls als ein Abkömmling des Ornithins aufgefasst werden, obwohl ich sie bisher nicht bei der Fäulniss dieses Körpers nachweisen konnte. Ist diese Voraussetzung richtig, so ist damit auch die Stellung der fraglichen Amidogruppe zum Carboxyl festgesetzt, da über die Stellung der beiden Amidogruppen zu einander kein Zweifel möglich ist.

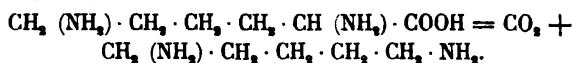
Nehmen wir also für das Ornithin die obige Formel an, so ist damit eine wichtige Erkenntniss für den Weg gewonnen, wie aus dem Eiweiss Pyridinderivate entstehen können, ohne dass wir in dem Eiweissmolekül einen präformirten Pyridinring annehmen müssen. Solche Pyridinderivate, die vielleicht aus Eiweiss entstehen, liefert uns aber nicht nur die Pflanze in zahlreichen Alkaloiden, sondern auch der Thierkörper, wie z. B. die Untersuchungen v. Fürth's²⁾ über die wirksame Substanz der Nebennieren andeuten. Wenn sich die Ansicht dieses Autors über die Constitution des Suprarenins durch die in Aussicht gestellten weiteren Analysen bestätigt, so ist die Beziehung zwischen dieser Substanz und dem Ornithin eine nahe.

1) Gabriel u. Oschan, Ber. d. d. chem. Ges. 24, 1364.

2) Diese Ztschr. Bd. XXVI, S. 15.

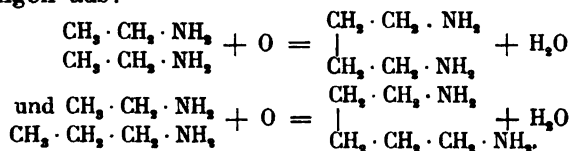
v. Fürth spricht dieselbe als ein Tetrahydrodioxypyridin an. Es braucht im Ornithin nur die α -Amidogruppe durch Hydroxyl ersetzt zu werden, damit aus demselben durch Wasseraustritt ein Körper von der Formel des Suprarenins entsteht. Die analoge Bildung eines Oxypiperidins aus δ -Amidovaleriansäure ist bereits durch Schotten¹⁾ erwiesen.

Analoge Betrachtungen wie diejenigen über die Beziehungen des Ornithins zum Putrescin gelten auch für das Verhältniss des Lysins zum Cadaverin. Dasselbe wird durch die Gleichung veranschaulicht:



Auch auf dem Wege über das Lysin ist somit ein Uebergang von den Eiweisskörpern zum Pyridinring gegeben. Denn wie Ladenburg²⁾ gezeigt hat, bildet sich aus dem Penta-methylendiamin durch trockenes Erhitzen unter Ammoniak-Abspaltung Piperidin.

Durch die beschriebenen Versuche findet aber auch zugleich die Entstehung der beiden bei der Eiweissfäulniss in grösster Menge entstehenden Basen Brieger's eine einfache Erklärung. Baumann hatte noch angenommen, dass diese Basen synthetisch aus 2 Molekülen Monaminen, deren Entstehung bei der Eiweissfäulniss von Brieger, Nencki u. A. beobachtet worden ist, unter Mitwirkung von Sauerstoff gebildet wurden. Er drückte die beiden Vorgänge durch die Gleichungen aus:



Diese Auffassung, welche auch in die Lehrbücher der physiologischen Chemie übergegangen ist, scheint mir schon deshalb unhaltbar, weil die Ausbeute an den Diaminen gerade bei gänzlichem Sauerstoffmangel die bedeutendste ist. An ihre Stelle wird vielmehr die treten müssen, dass durch hydrolytische

1) Ber. d. d. chem. Ges. 21, 2235.

2) Ber. d. d. chem. Ges. 18, 3100.

Spaltung aus den Eiweisskörpern Lysin und Arginin und aus diesem weiterhin Ornithin entsteht, und dass die beiden Diamidosäuren unter Kohlensäure-Abspaltung die Diamine liefern.

Nach dieser Annahme darf man erwarten, dass Putrescin in reichlicher Menge bei der Fäulniss solcher Substanzen auftritt, die bei der hydrolytischen Spaltung viel Arginin liefern. Durch Kossel's Untersuchungen über die Protamine aus dem Fischsperma haben wir in dieser Substanz eine solche Argininquelle kennen gelernt. Es gelang mir in der That, aus frischem Fischsperma grosse Quantitäten von Putrescin bei der Fäulniss zu isoliren.

Durch die Anwendung der Fäulnissmethode ist es gelungen, unsere Kenntnisse über die Constitution des Arginins bezw. Ornithins und Lysins zu einem gewissen Abschlusse zu bringen. Sie dürfte sich in manchen andern Fällen zur Aufklärung von Constitutionsfragen gerade bei solchen Körpern empfehlen, von welchen nur geringe Mengen zur Verfügung stehen.

Königsberg i. Pr., 15. März 1900.

Die Lymphe nach intravenöser Injection von Tetanustoxin und Tetanusantitoxin.

Von
Dr. F. Ransom.

(Aus der Abtheilung für experimentelle Therapie
des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie der Universität Marburg).
(Der Redaction zugegangen am 22. März 1900.)

Es ist schon bekannt, dass, wenn wir einem Thiere Tetanusgift oder Tetanusantitoxin unter die Haut injiciren, das Gift resp. Antitoxin bald in der Blutbahn nachgewiesen werden kann. Demnach erfolgt die Vertheilung dieser Stoffe im Körper jedenfalls zum Theil durch das Blut. Wir wissen ferner, dass das Gift sowohl wie das Antitoxin nach einem Zeitraum, welcher bei verschiedenen Thieren verschieden gross sein kann, in dem Blute nicht mehr zu finden sind. Wie sich die Lymphe an diesen Vorgängen betheiligt, ist bis jetzt nicht ermittelt worden. Um jedoch das Zustandekommen einer Vergiftung mit Tetanustoxin bzw. einer Heilung oder Immunisirung mit Antitoxin zu begreifen, schien es mir von Wichtigkeit, den Antheil, welchen die Lymphe an der Verbreitung des Giftes bzw. des Antitoxins im Körper nimmt, kennen zu lernen. Zu diesem Zweck sind die im Folgenden mitgetheilten Versuche angestellt worden. Sie gehören einer grösseren Versuchsreihe an, werden aber jetzt für sich veröffentlicht, da sie eine ziemlich abgerundete Arbeit bilden, deren Resultate, namentlich auch vom physiologischen Standpunkte aus betrachtet, nicht ohne Interesse sein dürften.

Als Versuchsthiere wurden Hunde gewählt, bei welchen Thieren die Freilegung des Ductus thoracicus auf keine Schwierigkeiten stösst. Die Thiere erhalten vor der Operation eine Dosis Morphinum und werden für die Dauer des Versuches

ätherisirt. Der freigelegte und an der Einmündungsstelle abgebundene Ductus wird dann mit einer Canüle versehen und die ausfliessende Lymphe in sterilisirten Gläsern aufgefangen. Die Lymphe fliesst continuirlich ab und ein angemessenes Wechseln der Behälter gestattet es, die auslaufende Lymphe in beliebigen Zeiträumen für sich aufzufangen.

Wenn zum Zweck einer vergleichenden Prüfung Blut gebraucht wurde, so ist dasselbe immer aus der arteria femoralis entnommen worden.

Wegen des langsameren Ausfliessens der Lymphe und wegen der Länge der Lymphbahn ist es eigentlich unzulässig, eine Lymphprobe mit einer gleichzeitig aufgefangenen Blutprobe hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu vergleichen.¹⁾ Für den Zweck dieser Arbeit jedoch glaubte ich diese Fehlerquelle vernachlässigen bezw. annähernd corrigiren zu können, indem ich im Moment der Blutentnahme ein frisches Glas an den Ductus brachte und die Lymphe, welche in den folgenden 15 Minuten ausfloss, zum Vergleich mit dem Blute benutzte. Uebrigens sind in den Tafeln die Zeiten genau angegeben.

Die sorgfältig gewogenen Hunde erhielten intravenös eine abgemessene Menge einer in ihrem Gift- bezw. Antitoxinwerth genau bekannten Lösung. Blut und Lymphe wurden dann auf Gift- bezw. Antitoxinwerth geprüft und mit einander verglichen. Zu diesen Prüfungen wurden Mäuse benutzt.

Die Berechnung des Gift- bezw. Antitoxinwerthes, sowohl der bei den Hunden angewandten Lösungen wie der verschiedenen einer Prüfung unterzogenen Lymph- und Blutproben, erfolgte, nach dem bekannten Schema von Behring²⁾, in + Ms, + ms und — Ms. Das zu den Versuchen gewählte Tetanusgift Nr. 5 wurde zu 10% in Wasser gelöst und die Lösung centrifugirt. Das Centrifugat enthielt in 1 ccm. 6 Millionen + Ms., d. h. 1 ccm. genügte, um 6 000 000 g Mäusegewicht nach 3 bis 4 Tagen zu tödten, oder $\frac{1}{6000000}$ ccm.

1) Cohnstein, Pflüger's Archiv. 1895. Bd. 59.

2) Behring, Allg. Therapie d. Infectiouskrankheiten. I. Theil. Cap. III. S. 963. Wien 1899.

tödtete eine Maus von 10 g Gewicht nach derselben Zeit. Wenn nun von dieser Lösung oder einer Verdünnung derselben eine abgemessene Menge einem gewogenen Hunde intravenös beigebracht wurde, so wusste man genau, wieviel + Ms pro 1 g Körpergewicht gegeben war, und konnte daraus berechnen, wieviel + Ms auf 1 ccm. Blut kamen.

1 Ms bedeutet nach Behring 1 g Lebend-Mäusegewicht. 1 + Ms ist die Giftmenge, welche 1 Ms nach 3 bis 4 Tagen an Tetanus tödtet; danach tödten 10 + Ms eine Maus von 10 g nach 3 bis 4 Tagen. Die Prüfung des entnommenen Blutes oder der Lymphe wurde, wie schon gesagt, an Mäusen ausgeführt. Vermuthete ich z. B. 100 + Ms in 1 ccm. und hatte ich eine Maus von 10 g Gewicht, so erhielt das Thier subcutan 0,4 ccm. einer Verdünnung $\frac{\text{Serum}}{4}$. Starb die Maus nach 3 bis 4 Tagen, so berechnete ich in 0,4 ccm. $\frac{\text{Serum}}{4} = 0,1$ ccm. Serum 10 + Ms = 100 + Ms in 1 ccm.; trat der Tod früher ein, so hatte das Serum einen höheren Werth; verendete die Maus später oder überhaupt nicht, so war der Giftwerth des Serums geringer als 100 + Ms in 1 ccm.

Die zu den Versuchen benutzte Antitoxinlösung (Serum eines immunisirten Pferdes) enthielt in 1 ccm. 40 Millionen — Ms, d. h. 1 ccm. der Antitoxinlösung neutralisirte (machte unschädlich) im Mischungsversuch 6,66 ccm. der Giftlösung = 40 Millionen + Ms; eine Mischung von 0,2 ccm. $\frac{\text{Giftlösung}}{30} = 40000$ + Ms mit 0,2 ccm. $\frac{\text{Antitoxinlösung}}{200}$ einer Maus subcutan injicirt, rief demzufolge keinen oder nur ganz leichten Tetanus hervor.

Die Prüfung des Blutes bezw. der Lymphe auf Antitoxinwerth wurde gleichfalls an Mäusen ausgeführt, aber in diesem Falle ohne auf das Körpergewicht genaue Rücksicht zu nehmen. Erwartete ich z. B. etwa 100000 — Ms (das —-Zeichen bedeutet Antitoxin), so wurden 0,5 ccm. Serum mit 0,1 ccm. $\frac{\text{Giftlösung}}{12} = 50000$ + Ms gemischt und einer Maus unter die Haut injicirt. Zeigte das Thier keine Tetanus-symptome, so musste der Antitoxinwerth des Serums mindestens 100000 — Ms in 1 ccm. sein, wurde die Maus krank oder starb sie, so war der Antitoxinwerth geringer. Indem zugleich auf zwei oder drei verschiedene Werthe geprüft wurde, liessen sich die Grenzzahlen meistens schnell und genügend genau ermitteln.

Der indirekte Giftwerth des Tetanusgiftes, d. h. die antitoxin-neutralisirende Energie wird durch das Zeichen + ms zum Ausdruck

gebracht. Die 10%ige Lösung des Tetanusgiftes Nr. 5 enthält 6000 000 + ms in 1 ccm., d. h. 0,2 ccm. $\frac{\text{Gifflösung}}{30} = 40000 + \text{Ms}$ brauchte 0,2 ccm. $\frac{\text{Antitoxinlösung}}{200} = 40000 - \text{Ms}$, wenn eine unschädliche Mischung ohne Ueberschuss von Antitoxin hergestellt werden sollte. Somit ist beim Tetanusgift Nr. 5 der direkte (+ Ms) und der indirekte (+ ms) Giftwerth gleich gross. In weniger concentrirten Lösungen ist die antitoxinneutralisirende Energie des Giftes jedoch verhältnissmässig grösser, z. B. eine Mischung von 40000 + Ms mit 40000 — Ms gibt O, während 10000 + Ms gemischt mit 10000 — Ms tetanische Symptome hervorrufen. Demnach würden 10000 — Ms durch weniger als 10000 + Ms neutralisirt werden. Den wirklichen indirekten Giftwerth habe ich aus Behring's Tabelle (l. c. S. 1023) berechnet und bei der Schätzung der indirekten Giftwerthe in Tafel 1 angewendet.

In den Tafeln sind die Prüfungsergebnisse der einzelnen Mäuseversuche angegeben, wozu zu bemerken ist, dass

- O keine Symptome,
- leichter localer Tetanus,
- = schwere locale Erscheinungen,
- ≡ ausgebreiteter Tetanus mit allgemeinen Krankheitserscheinungen,
- + Tod an Tetanus

bedeutet.

Zu den Prüfungen ist immer das Serum des Blutes bzw. der Lymphe angewandt worden.

Die Einführung des Giftes bzw. des Antitoxins in die Blutbahn dauerte bei jedem Hunde 2 bis 3 Sekunden.

Die Zeit für die Entnahme der verschiedenen Blut- und Lymphproben wird vom Moment der fertigen Gift- bzw. Antitoxineinverleibung ab berechnet.

Einführung des Tetanusgiftes in die Blutbahn nach Eröffnen des Ductus thoracicus.

Protokoll 1.

Hund Nr. 3	1. II. 00.	9. II. Stirbt ohne
12700 g	Eröffnung des Ductus thoracicus und	Tetanus.
	5 Minuten nachher Einführung in die V.	
	jugularis externa von	
	$\frac{\text{Tetanusgiftlösung}}{10} = 0,022 \text{ g}$	
	2,2 ccm.	
	Trockengiftes = 110 + Ms pro 1 g	
	Körpergewicht.	

Die Art und Weise der Giftwerthbestimmungen soll durch die folgenden Protokolle veranschaulicht werden.

Protokoll 2.

Maus Nr. 147	1. II. 00, 7 Uhr Abends.	2. II. 9 Uhr M. Spur
12,5 g	0,5 ccm. Lymphserum Hund 3 erste	9 > A. —
	$\frac{1}{4}$ Stunde.	3. II. 9 > M. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 25 + Ms.	9 > A. =
		4. II. + gefunden.
		Ca. 60 Stunden.

Protokoll 3.

Maus Nr. 205	8. II. 00, 3 Uhr.	9. II. —
16,5 g	0,4 ccm. $\frac{\text{Lymphserum Hund 3}}{2,5}$ erste	10. II. —
	$\frac{1}{4}$ Stunde.	11. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 100 + Ms.	12. II. =
		13. II. =
		14. II. + gef.
		Ca. 5 $\frac{1}{2}$ Tage.

Protokoll 4.

Maus Nr. 149	1. II. 00, 7 Uhr Abends.	2. II. 9 Uhr M. —
13 g	0,5 ccm. Lymphserum Hund 3 zweite	9 > A. =
	$\frac{1}{4}$ Stunde.	3. II. 9 > M. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 26 + Ms.	5 > A. +
		46 Stunden.

Protokoll 5.

Maus Nr. 202	8. II. 00, 3 Uhr.	9. II. —
16,5 g	0,4 ccm. $\frac{\text{Lymphserum Hund 3}}{5}$ zweite	10. II. —
	$\frac{1}{4}$ Stunde.	11. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 200 + Ms.	12. II. =
		13. II. =
		14. II. =
		15. II. =
		16. II. + gef.
		Ca. 7 $\frac{1}{2}$ Tage.

Protokoll 6.

Maus Nr. 156	1. II. 00, 7 Uhr Abends.	2. II. —
18 g	0,32 ccm. $\frac{\text{Blutserum Hund 3}}{10}$ 3 Stunden.	3. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 500 + Ms.	4. II. =
		5 Uhr +
		3 Tage.

Protokoll 7.

Maus Nr. 201 18 g	8. II. 00, 3 Uhr.	9. II. Spur
	0,45 ccm. $\frac{\text{Lymphserum Hund 3}}{12,5}$ 3 bis	10. II. =
	3 1/4 Stunden.	11. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 500 + Ms.	12. II. =
		13. II. =
		14. II. =
		15. II. =
		16. II. =
		17. II. =
		18. II. + gef.
		Ca. 9 1/2 Tage.

Protokoll 8.

Maus Nr. 178 12,5 g	3. II. 00, 1 Uhr.	4. II. =
	0,4 ccm. $\frac{\text{Lymphserum Hund 3}}{8}$ 4 bis	5. II. =
	5 Stunden.	6. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 250 + Ms.	7. II. =
		Mittags +
		4 Tage.

Protokoll 9.

Maus Nr. 173	3. II. 00, 1 Uhr.	4. II. =
	0,1 ccm. $\frac{\text{Tet.-Antitoxinlösung}}{10000} =$	5. II. =
	400 — Ms.	6. II. + gef.
	0,5 ccm. Lymphserum Hund 3, 4 bis	Ca. 2 1/2 Tage.
	5 Stunden.	
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 160 + ms.	

Protokoll 10.

Maus Nr. 196	8. II. 00, 3 Uhr.	9. II. Spur
	0,1 ccm. $\frac{\text{Tet.-Antitoxinlösung}}{4000} =$	10. II. =
	1000 — Ms.	11. II. =
	0,5 ccm. Lymphserum Hund 3, 4 bis	12. II. =
	5 Stunden.	13. II. =
	Serum geprüft auf 1 ccm. = 500 + ms.	14. II. =
		15. II. =
		16. II. =
		17. II. =
		30. II. =
		25. II. =
		erholte sich.

Es würde zu weit führen, alle Protokolle ausführlich wiederzugeben. Die obigen genügen, um die Prüfungsart zu demonstrieren.

Tafel 1 stellt die Ergebnisse in übersichtlicher Form dar.

Zunächst sehen wir, dass das Gift schnell in der Lymphe erscheint. Die Lymphe, welche ich in den ersten 15 Minuten nach der Gifteinjection sammelte, enthielt ca. 75 + Ms in 1 ccm.; die zur Prüfung der Lymphe auf 25 + Ms gebrauchte Maus ist schnell gestorben, das zur Prüfung auf 100 + Ms benutzte Thier erst nach 5 $\frac{1}{2}$ Tagen, also liegt der Giftwerth ca. bei 75 + Ms. In der Lymphe von der 2^{ten} Viertelstunde ist der Werth auf ca. 125 + Ms in 1 ccm. gestiegen, und in der in dem Zeitraum von 60 bis 75 Minuten (5^{te} Viertelstunde) aufgefangenen Lymphe haben wir in 1 ccm. schon über 270 etwa 350 bis 400 + Ms. Während der nächsten 5 Stunden merken wir ein Sinken des Giftwerthes von ca. 350 auf ca. 250 + Ms in 1 ccm. Die indirekten Giftwerthe der Lymphe sind in demselben Zeitraum gleichfalls allmählich gefallen, so dass man einen deutlichen, wenn auch kleinen Unterschied zwischen den einzelnen Prüfungen auf 500 + Ms wahrnehmen kann. Blut wurde erst 3 und dann 6 Stunden nach der Gifteinjection zum Vergleich mit der Lymphe entnommen. Die Prüfung der ersten Blutprobe ergab etwas mehr als 500, aber weniger als 1000 + Ms, also ca. 750 bis 800 + Ms in 1 ccm. 6 Stunden nach der Gifteinjection war der Giftwerth des Blutes etwas gesunken. Dies wurde dadurch angedeutet, dass die Maus, bei welcher die Prüfung auf 2000 + Ms ausgeführt wurde, nur mässige Krankheitserscheinungen zeigte, während das Thier, welches zur Prüfung des 3 Stunden nach der Gifteinjection entnommenen Blutes auf dieselbe Zahl von + Ms gedient hatte, starb. Auch der indirekte Giftwerth des Blutes war 3 Stunden nach der Gifteinjection grösser als nach 6 Stunden, wie man aus einem Vergleich der beiden Prüfungen auf 500 + ms ersehen kann.

Vergleichen wir nun Blut und Lymphe mit einander, so sehen wir, dass der Giftwerth des Blutes etwas höher war, sowohl bei der Entnahme nach 3 Stunden als auch nach 6 Stunden.

Hund Nr. 3 starb 23 Stunden nach der Operation, ohne Tetanussymptome gezeigt zu haben. Sofort nach dem Tode wurde das Herz geöffnet und Blut zur Prüfung daraus entnommen. Es ergab sich, dass das Blut in dem Zeitraum von

Lymphserum.

Zeit nach der Gift- injection	Direkte Prüfung				Indirekte Prüfung		
	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Direkter Giftwerth in 1 ccm. circa	Trockengift in 1 ccm. circa	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Indirekte Giftwerth in 1 ccm circa
Erste 1/4 Stunde	25 + Ms.	+2 1/4 Tage	75 + Ms.	0,00000125 g			
	100 + Ms.	+5 1/4 Tage					
Zweite 1/4 Stunde	26 + Ms.	+2 Tage	125 + Ms.	0,00000208 g			
	200 + Ms.	+7 1/4 Tage					
1—1 1/4 Stunde	25 + Ms.	+24 Stunden	400 + Ms.	0,00000664 g			
	270 + Ms.	+3 Tage			40 + ms.	+1 1/2 Tag	650 + ms
	500 + Ms.	+5 1/2 Tage			500 + ms.	+10 1/2 Tage	
2—2 1/4 Stunden	24 + Ms.	+24 Stunden	350 + Ms.	0,00000581 g	80 + ms.	+2 Tage	600 + ms
	250 + Ms.	+3 1/2 Tage			500 + ms.	=	
3—3 1/4 Stunden	250 + Ms.	+3 1/2 Tage	300 + Ms.	0,00000498 g			
	500 + Ms.	+9 1/2 Tage					
	1000 + Ms.	=					
	2000 + Ms.	—			500 + ms.	=	580 + ms
4—5 Stunden	36 + Ms.	+1 1/2 Tag	250 + Ms.	0,00000415 g	160 + ms.	+2 1/2 Tage	550 + ms
	250 + Ms.	+4 Tage			500 + ms.	=	
6—6 1/4 Stunden	26 + Ms.	+1 1/2 Tag	250 + Ms.	0,00000415 g			
	240 + Ms.	+3 1/2 Tage					
	250 + Ms.	+4 Tage					
	1000 + Ms.	=			200 + ms.	+3 Tage	530 + ms
	2000 + Ms.	—			500 + ms.	=	

Digitized by Google

der 6^{ten} bis zu der 23^{ten} Stunde nach der Giftinjection einen beträchtlichen Verlust an Giftwerth erlitten hatte, denn bei Prüfung auf 500 + Ms starb die entsprechende Maus erst nach 8 $\frac{1}{2}$ Tagen. Genügende Lymphe zur Prüfung konnte ich post mortem nicht gewinnen.

Der Giftwerth der Lymphe 3 Stunden nach der Giftinjection war etwa 300 + Ms, der des Blutes ca. 750 bis 800 + Ms in 1 ccm. — ein Verhältniss von 1:2,6. 6 Stunden nach der Giftinjection war der Giftwerth der Lymphe 250 + Ms, der des Blutes ca. 600 bis 650 + Ms in 1 ccm. = 1:2,6. Danach war der relative Giftverlust aus dem Blute und der Lymphe in dem Zeitraum von 3 bis 6 Stunden nach der Injection annähernd der gleiche.

Der Versuch an Hund Nr. 3 beweist, dass ein Theil des in die Blutbahn eingebrachten Tetanusgiftes schnell aus dem Blute in die Lymphe gelangt. In 3 Stunden, vielleicht auch schon früher, war eine Art von Gleichgewicht zustande gekommen, welches von da an bestehen blieb. Eine allmähliche Entgiftung fand zwar im Blute wie in der Lymphe statt, aber das Giftverhältniss der beiden Flüssigkeiten zu einander änderte sich nicht.

Um die Schärfe, mit welcher der Organismus der Maus auf das Tetanusgift reagirt, etwas deutlicher hervortreten zu lassen, habe ich einige der gefundenen Werthe in Gramme des Trockengiftes umgerechnet. Wenn wir z. B. in 1 ccm. der Lymphe von der 1^{ten} Viertelstunde ca. 75 + Ms gefunden haben, so entspricht dies 0,00000125 g des Trockengiftes; oder wenn in 1 ccm. des Lymphserums von 3 bis 3 $\frac{1}{4}$ Stunden nach der Injection 300 + Ms gegenüber 800 + Ms in 1 ccm. Blutserum derselben Zeit steht, so gibt dies in 1 ccm. Blutserum 0,0000133 g, in 1 ccm. Lymphserum dagegen 0,000005 g Trockengift; eine Differenz von 0,0000083 g. Ein solcher Unterschied in der Giftdosis macht sich, wie wir gesehen haben, im Organismus der Maus deutlich geltend, denn die Lymphgiftmaus ist erst nach 10 Tagen, die Blutgiftmaus dagegen schon am 3^{ten} Tage gestorben.

Es ist ferner bemerkenswerth, dass der grösste Theil des eingeführten Giftes im Blute und in der Lymphe wieder aufgefunden werden konnte. Rechnen wir das Blut als 1:1,2

des Körpergewichts und das Blutserum als $\frac{2}{3}$ des Blutes und nehmen wir an, dass die Menge der Lymphe ungefähr gleich der des Blutes sei, so können wir sagen: eingebracht in die Blutbahn $110 + Ms$ pro 1 g Körpergewicht = $1320000 + Ms$,

daher $\frac{1320000}{\frac{1}{18} + \frac{1}{12} \cdot 12700} = 747 + Ms$ in 1 ccm. Blutlymphserum.

Nach 3 Stunden sind wieder gefunden worden in 0,5 ccm. Blutserum ca. $400 + Ms$ und in 0,5 ccm. Lymphserum ca. $150 + Ms$ = in 1 ccm. Blutlymphserum $550 + Ms$, demnach ein Verlust von ungefähr 26 % der injicirten Giftmenge, wenn wir nur den direkten Giftwerth berücksichtigen. Ein ganz kleiner Theil des nicht mehr aufgefundenen Giftes ist natürlich mit der abfließenden Lymphe aus dem Körper entfernt worden. Der ganze Verlust erscheint weniger bedeutend, wenn wir die Zahlen in Gewichte des Trockengiftes übersetzen:

Eingebracht pro 1 ccm. Blutlymphserum	0,00001041 g.
Gefunden	0,00000816 g.
Verlust pro 1 ccm.	0,00000225 g.

Um nun das Giftverhältniss zwischen dem Blute und der Lymphe längere Zeit nach der Giftinjection studiren zu können, erhielt ein zweiter Hund ungefähr dieselbe Giftmenge wie Hund Nr. 3, aber der Ductus thoracicus wurde erst 26 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Giftinjection geöffnet, um Lymph- und Blutserum zu vergleichen.

Versuch II.

Eröffnen des Ductus thoracicus 26 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Einführung des Tetanusgiftes in die Blutbahn.

Protokoll 11.

Hund Nr. 6 5700 g	12. II. 00, 9 Uhr Morgens.	13. II. Morgens
	Tet. Giftlösung 28. 1. 00	11 Uhr gesund.
0,7 ccm.	$\frac{6}{6}$ in eine	14. II. + gef.
Ohrvene =	122 + Ms pro 1 g Körpergewicht.	
	13. II. 00.	
	11.30 Uhr. Eröffnen des Ductus thoracicus. Blutentnahme aus der arteria femoralis.	
	6 Uhr. Blutentnahme aus der arteria femoralis.	

Der Hund war anscheinend ganz gesund, als ich die Vorbereitungen zum Eröffnen des Ductus machte, und als er am Schluss des Versuches aus der Aethernarkose erwachte, war nichts von Tetanus zu bemerken.

Die Ergebnisse der Prüfungen der Lymphe und des Blutes sind in Tafel 2 wiedergegeben.

Tafel 2. — Hund 6.

Lymphserum.

Zeit nach der Gift- injection	Direkte Prüfung			Indirekte Prüfung		
	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Direkter Giftwerth in 1 ccm. circa	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Indirekter Giftwerth in 1 ccm. circa
26 1/2 Stunden bis 26 3/4 Stunden	100 + M.	+2 1/2 Tage	220 + M.			500 + M.
	250 + M.	+5 1/2 Tage		83 + M.	+9 1/2 Tage	
	500 + M.	=		500 + M.	—	
	2000 + M.	—		2700 + M.	○	
	10000 + M.	○				
33 bis 33 1/4 Stunden	100 + M.	+2 1/2 Tage	200 + M.	83 + M.	=	360 + M.
	500 + M.	=				

Blutserum.

26 1/2 Stunden	100 + M.	+2 1/2 Tage	250 + M.			550 + M.
	250 + M.	+4 Tage		83 + M.	+2 1/2 Tage	
	500 + M.	=		500 + M.	=	
	2000 + M.	○		2700 + M.	○	
	10000 + M.	○				
33 Stunden	100 + M.	+2 1/2 Tage	230 + M.	83 + M.	=	360 + M.
	500 + M.	=				

Zunächst bemerken wir, dass im Laufe der 26 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Giftinjection ein beträchtlicher Verlust an direktem Giftwerth stattgefunden hatte. Der Hund erhielt im Ganzen 700000 + Ms intravenös, und wenn wir wie bei Hund Nr. 3

rechnen, so haben wir
$$\frac{700000}{\frac{1}{12} + \frac{1}{18} \cdot 5700} = 875 + \text{Ms pro}$$

1 ccm. Blutlymphserum injicirt, wovon etwa 250 + Ms nach 26 $\frac{1}{2}$ Stunden noch vorhanden waren. Bei Hund Nr. 3 waren im Blute nach 23 Stunden ca. 250 + Ms in 1 ccm. noch nachzuweisen. Der Giftwerth des Blutes ist ein wenig höher als der der Lymphe zu schätzen, da die Maus, welche zur Prüfung auf 250 + Ms in 1 ccm. diente, früher gestorben ist als die entsprechende Maus bei der Prüfung der Lymphe. Diese Schätzung wird bestätigt bei Betrachtung des indirekten Werthes, welcher auch etwas geringer bei der Lymphe als beim Blute war. Immerhin ist der Unterschied in direktem Giftwerth zwischen dem Blut- und dem Lymphserum ein sehr geringer. 6 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der ersten Blutentnahme, also 33 Stunden nach der Giftinjection, wurde wieder Blut aus der arteria entnommen und mit Lymphe verglichen, dabei konnte nur ein kleiner Verlust an Gift, am besten angedeutet in der indirekten Prüfung auf 83 + Ms constatirt werden.

In einer Beziehung ist ein beachtenswerther Unterschied zwischen dem Blutgift und dem Lymphgift bei Hund Nr. 6 wahrzunehmen. Die Differenz nämlich³⁾ (sogenannter D-Werth) zwischen der tödtlichen Minimaldosis und der Dosis, welche eben wahrnehmbare tetanische Symptome auslöst, ist, wenn wir die Prüfungen nach 26 $\frac{1}{2}$ Stunden in Betracht ziehen, etwas grösser bei der Lymphe als bei dem Blute, denn ob schon das Blut ein wenig mehr Gift enthielt als die Lymphe, so ist doch die Maus bei der Prüfung der Lymphe auf 2000 + Ms leichtkrank geworden, aber die entsprechende Maus bei der Prüfung des Blutes ist ohne Krankheitserschei-

³⁾ Behring, Allg. Therapie der Infektionskrankheiten. II. Theil, S. 1061, Wien 1900.

nungen geblieben. Freilich ist der Unterschied nur ein sehr geringer.

Die Ergebnisse der Prüfungen bei den beiden Hunden stimmen, sofern sie vergleichbar sind, gut mit einander überein. Bedeutungsvoll ist die Thatsache, dass bei intactem Ductus thoracicus etwa 26 Stunden nach der intravenösen Injection des Tetanusgiftes (Hund 6) eine beinahe gleichmässige Vertheilung des Giftes zwischen dem Blute und der Lymphe stattgefunden hatte.

Bei dem Uebergang aus der Blutbahn in die Lymphe scheint das Tetanusgift an sich keine wesentliche Veränderung erlitten zu haben. Die Symptome der Blutgiftmäuse waren von der der Lymphgiftmäuse ununterscheidbar. Bei den Prüfungen der indirekten Giftwerthe ist nichts Auffallendes beobachtet worden.

Nachdem das Verhältniss des Toxins im Blute zu dem Toxin in der Lymphe in dieser Weise untersucht worden war, lag es nahe, ähnliche Versuche mit Antitoxin auszuführen.

Versuch III.

Einführung des Tetanusantitoxins in die Blutbahn nach Eröffnen des Ductus thoracicus.

Protokoll 12.

Hund Nr. 4	6. II. 00.	Genas.
12 600 g	Eröffnung des Ductus thoracicus. 10 Minuten nachher Einführung in die V. jugularis externa von 10 ccm. Tetanus- antitoxinlösung (Pferdeserum) = 320 000 — Ms pro 1 g Körpergewicht. 6 Stunden nach der Antitoxininjection Blut abgenommen aus der arteria femoralis.	

Zunächst musste man sich informiren, ob die Hundelymphe an sich einen Einfluss auf das Tetanustoxin ausübe. Zu diesem Zweck wurde vor der Injection des Antitoxins etwas Lymphe gesammelt und damit Kontrollversuche gemacht.

Protokoll 13.

Maus Nr. 186 14,4 g	7. II. 00, 4 Uhr Nachmittags.	8. II. 9 Uhr M. 0?
	$\left\{ \begin{array}{l} 0,1 \text{ ccm. } \frac{\text{Tet.-Gifflösung 28. 1. 00}}{12000} = 50 + \text{Ms.} \\ 0,5 \text{ ccm. Lymphserum von Hund 4 vor} \\ \text{der Antitoxininjection.} \end{array} \right.$	5 „ A. — 9. II. 9 „ M. = 5 „ A. = 10. II. 9 „ M. + gef. Ca. 60 Stunden.

Protokoll 14.

Maus Nr. 188 13,5 g	7. II. 00, 7 Uhr Abends.	8. II. 9 Uhr M.
	$\left\{ \begin{array}{l} 0,4 \text{ ccm. } \frac{\text{Tet.-Gifflösung 28. 1. 00}}{48000} = 50 + \text{Ms.} \end{array} \right.$	Spur 5 Uhr A. — 9. II. 9 „ M. = 5 „ A. = 10. II. 9 Uhr M. = 10 „ „ + 63 Stunden.

Ein deutlicher Unterschied in dem Verlauf der Krankheit, je nachdem die Gifflösung mit Serum oder mit Wasser verdünnt wurde, war danach nicht wahrzunehmen.

Wir gehen jetzt zu der Betrachtung der Blut- und Lymphprüfungen über, deren Ergebnisse in Tafel 3 zu finden sind.

Tafel 3. — Hund 4.

Lymphserum.

Zeit nach der Antitoxininjection	Prüfung auf Antitoxinwerth		
	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Antitoxinwerth in 1 ccm. circa
Erste $\frac{1}{4}$ Stunde	10 000—Ms.	○	30 000—Ms.
	40 000—Ms.	=	
	100 000—Ms.	+ 24 Stunden	
Zweite $\frac{1}{4}$ Stunde	100 000—Ms.	○	250 000—Ms.
	250 000—Ms.	○	
	500 000—Ms.	+ 32 Stunden	

Zeit nach der Antitoxininjection	Prüfung der Antitoxininjection		
	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Antitoxinwerth in 1 ccm. circa
1—1½ Stunden	500 000—Ms.	○	800 000—Ms.
	1 000 000—Ms.	+ 5 Tage	
	1 200 000—Ms.	+ 48 Stunden	
2—2½ Stunden	1 000 000—Ms.	+ 5½ Tage	850 000—Ms.
	1 200 000—Ms.	+ 63 Stunden	
3—3½ Stunden	1 000 000—Ms.	+ 7 Tage	900 000—Ms.
	1 200 000—Ms.	+ 3½ Tage	
4—4½ Stunden	1 000 000—Ms.	—	950 000—Ms.
	1 200 000—Ms.	≡	
6—6½ Stunden	1 200 000—Ms.	○	1 200 000—Ms.
	1 600 000—Ms.	≡	
	2 000 000—Ms.	+ 30 Stunden	

Blutserum.

6 Stunden	2 500 000—Ms.	○	3 000 000—Ms.
	3 000 000—Ms.	spur.	
	4 000 000—Ms.	+ 3½ Tage	

Schon in den ersten 15 Minuten nach der Antitoxininjection war eine beträchtliche Menge Antitoxin aus dem Blute in die Lymphe übergetreten. Da die für die Prüfung auf 10000 — Ms gebrauchte Maus gesund blieb, das für die Prüfung auf 40000 — Ms benutzte Thier dagegen mässig krank wurde, so können wir dem Lymphserum für diese Periode einen Antitoxinwerth von ca. 30000 — Ms in 1 ccm. zuschreiben. In der 2^{ten} Viertelstunde liegt der Antitoxinwerth des Lymphserums bei ca. 250000 — Ms in 1 ccm. Das Lymphserum aus dem Zeitraum 1 Stunde bis 1½ Stunden nach der Injection hat ca. 800000 Ms in 1 ccm. Von diesem

Zeitpunkt an steigt der Antitoxinwerth in langsamerem Tempo. In dem Lymphserum aus der Periode 2 bis 2 $\frac{1}{2}$ Stunden war 1 Million — Ms in 1 ccm. noch nicht erreicht — die entsprechende Maus starb nach 5 $\frac{1}{2}$ Tagen. Sogar bei der Prüfung des Lymphserums aus dem Zeitraum 4 bis 4 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Injection wurde die für die Prüfung auf 1 Million — Ms gebrauchte Maus leicht krank. Wir nehmen demnach, bei Betrachtung der Tafel 3, eine stetige Steigerung des Antitoxinwerthes des Lymphserums bis zum Ende des Versuches wahr, aber die Steigerung war während der ersten Stunde schneller als nachher. Sechs Stunden nach der Antitoxininjection wurde Blut aus der Arteria femoralis entnommen. Die Prüfung ergab einen Antitoxinwerth von knapp 3 Millionen — Ms in 1 ccm. Serum. Da das Lymphserum aus der Periode 6 bis 6 $\frac{1}{2}$ Stunden ca. 1,2 Million — Ms in 1 ccm. hatte, so war das Antitoxinverhältniss von Blutserum zu Lymphserum etwa wie 2,6 : 1 in der Volumeinheit.

Um den Krankheitsverlauf bei den Prüfungen zu veranschaulichen, gebe ich hier einige Protokolle wieder.

Protokoll 15.

Maus Nr. 194 16 g	8. II. 00.		9. II. Spur
	Tet.-Giftlösung 28. I. 00.		10. II. —
	0,1 ccm.	$\frac{30}{30} = 20000 + \text{Ms}$	11. II. —
	0,5 ccm. Lymphserum Hund 4		12. II. —
	1 ^{te} Viertelstunde.		13. II. —
	Serum geprüft auf 40000 — Ms in 1 ccm.		14. II. —
			15. II. —
			16. II. —
			erholte sich
			allmählich.

Protokoll 16.

Maus Nr. 265 11,5 g	19. II. 00.		20. II. —
	Tet.-Giftlösung 28. I. 00.		21. II. —
	0,2 ccm.	$\frac{30}{30} = 40000 + \text{Ms}$	22. II. —
	Lymphserum Hund 4		23. II. —
	1 bis 1 $\frac{1}{2}$ Stunden		24. II. —
	0,2 ccm.	$\frac{5}{5}$	25. II. +
	Serum geprüft auf		gefunden
	1 ccm. = 1 Million — Ms.		5 $\frac{1}{2}$ Tage.

Blutserum.

Zeit nach der Antitoxininjection	Prüfung der Antitoxininjection		
	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Antitoxinwerth in 1 ccm. circa
68 Stunden	400 000—Ms.	+ 36 Stunden	200 000—Ms.
	300 000—Ms.	+ 2 1/2 Tage	
	250 000—Ms.	≡	
	200 000—Ms.	○	

Wir können aus der Tafel entnehmen, dass auch 68 Stunden nach der intravenösen Injection des Antitoxins das Blutserum beträchtlich mehr Antitoxin als das Lymphserum enthielt. Die Zahlenverhältnisse sind ca. 200 000 — Ms in 1 ccm. Blutserum und ca. 75 000 — Ms in 1 ccm. Lymphserum, also etwa 2,6 : 1.

Eine bedeutende Menge Antitoxin war während der 68 Stunden aus dem Blut-Lymphkreislauf verschwunden, denn obschon der Hund, wenn wir wie bei Hund 3 rechnen, $\left(\frac{400\,000\,000}{\frac{1}{18} + \frac{1}{12} \cdot 12\,250} = \text{ca. } 280\,000 \right)$ gleich nach der Antitoxininjection ca. 280 000 — Ms in 1 ccm. Blut-Lymphserum hatte, so fand ich nach Verlauf von 68 Stunden nur 137 500 — Ms in 1 ccm. wieder.

Sehr beachtenswerth ist die Thatsache, dass nach so langer Zeit das Blutserum immer noch bedeutend mehr Antitoxin als das Lymphserum enthielt. Somit verhält sich das Antitoxin in dieser Beziehung ganz anders als das Toxin, denn wie wir bei Hund Nr. 4 gesehen haben, war bei intactem Ductus thoracicus 26 Stunden nach der Giftinjection der Giftgehalt der Lympe dem des Blutes annähernd gleich.

Wenn diese Versuche eigentlich als ein Beitrag zu der Tetanusfrage anzusehen sind, so haben sie ausserdem noch ein physiologisches Interesse. Aehnliche Bestimmungen mit

anderen Stoffen wie Zucker, Kochsalz, Jodnatrium, Pepton u. s. w. sind gemacht worden, so viel mir jedoch bekannt, ist hier zum ersten Male der Versuch gemacht, ein in die Blutbahn eingeführtes Bakteriengift quantitativ in der Lymphe nachzuweisen. H. Nasse¹⁾ injicirte Zucker in die Blutbahn. Schon in den ersten Minuten trat Zucker aus dem Blute in die Lymphe und bald wurde der Gehalt der Lymphe an Zucker erheblich grösser als der des Blutes. Shore²⁾ fand, dass Pepton, langsam in die Blutbahn eingeführt, mit dem Harn ausgeschieden wurde, ohne deutlich in der Lymphe zu erscheinen. Wurde das Pepton schnell in die Blutbahn gebracht, so trat es hauptsächlich in die Lymphe über. Acht Minuten nach der Injection von 4,3 g Pepton war kein Pepton mehr im Blute nachweisbar. Heidenhain³⁾ untersuchte den Procentgehalt des Blutes und der Lymphe an Zucker nach intravenöser Injection. Gleich nach Beendigung der Injection beginnt der Zuckergehalt des Blutes zu sinken, der Zuckergehalt der Lymphe steigt aber trotzdem. Nach einiger Zeit beginnt auch der Zuckergehalt der Lymphe zu fallen, aber langsamer, so dass der Unterschied zwischen beiden noch zunimmt. Nach intravenöser Injection von Jodnatrium fand Asher⁴⁾ nach 10—15 Minuten mehr Jodnatrium im Blute als in der Lymphe; nach 2 Stunden 40 Minuten mehr in der Lymphe als im Blute. Cohnstein⁵⁾ injicirte Ferrocyanatiumlösung in die Blutbahn und untersuchte Blut und Lymphe mittelst der Berlinerblau-Reaction. Er fand:

4 Min. nach der Injection	{	Lymphe kaum Reaction.
		Blut deutlich.
22 „ „ „ „	{	Lymphe maximum.
		Blut negativ.
48 „ „ „ „	{	Lymphe noch deutlich.
		Blut negativ.

1) H. Nasse, Lymphbildung. Marburg, 1872.

2) Shore, On the Fate of Peptone in the Lymphatic System. Journal of Physiology, 1890. Vol. XI, S. 529.

3) Heidenhain, Pflüger's Archiv, 1891, Bd. 49.

4) Asher, Zeitschr. f. Biologie. Bd. XXIX, 1892.

5) Cohnstein, Pflüger's Archiv, 1895, Bd. 59, S. 508; 1896, Bd. 63, S. 587.

Hierher gehören auch viele andere Versuche Cohnstein's. Mendel¹⁾ berichtete über Resultate ähnlich wie Heidenhain. Popoff²⁾ hat das Concentrationsmaximum bei Zucker niemals höher in der Lymphe als im Blute gefunden. J. Munk³⁾ spritzte Strychnin unter die Kopfhaut von Kaninchen und legte das entsprechende Lymphgefäss frei. Die Symptome erschienen zur selben Zeit, ob die Lymphbahn nach aussen geöffnet oder normal war. In der abgeleiteten Lymphe war Strychnin niemals sicher nachzuweisen.

Unser Tetanusgift ist eine Fällung aus Pepton-Fleischbouillon, und man hätte vielleicht erwarten können, dass das Gift mehr Aehnlichkeit mit Pepton als mit den andern oben erwähnten Stoffen zeigen würde. So liegt die Sache aber nicht, denn während Pepton sogar in Spuren in die Blutbahn eingeführt, schnell aus dem Blute entfernt und durch den Harn ausgeschieden wird,⁴⁾ vertheilt sich das Tetanusgift in Blut und Lymphe und verschwindet gleichmässig und langsam aus beiden. In dieser Beziehung ist noch zu erwähnen, dass das Tetanusgift, d. h. die Mischung von Gift mit fremden Substanzen, welche wir aus Mangel an einem reinen Präparat das Tetanusgift nennen, ein schwer dialysirbarer Körper ist⁵⁾ (ich habe Giftlösung drei Tage lang in einer Diffusionshülse von Schleicher und Schüll gegen fliessendes Wasser dialysirt ohne bedeutenden Verlust), was jedoch nicht verhindert, dass ein Theil schnell aus der Blutbahn in die Lymphe übertritt.

Unsere Kenntniss von der Natur der Antitoxine ist noch mangelhaft und wir wissen nicht, unter welcher chemischen Form sie im Serum existiren. In Anbetracht jedoch der näheren Beziehungen zwischen den Antitoxinen und den Proteinstoffen ist es eine interessante Beobachtung, dass das Tetanusantitoxin so schnell und in solchen Mengen aus dem

1) Lafayette Mendel, Journal of Physiology, Bd. XIX, S. 227.

2) Popoff, Centralblatt f. Physiologie, Bd. 9, S. 52.

3) J. Munk, Du Bois-Archiv, 1895, S. 387.

4) Hoffmeister, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. V, 1881.

Neumeister, Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXIV, 1888.

5) Tizzoni und Cattani, Centralblatt f. Bakteriologie, 1890, S. 69.

Blute in die Lymphe übergeht. Ob es in Verbindung mit anderen Bestandtheilen des Serums oder frei für sich austritt, lässt sich aus den Versuchen nicht entscheiden, jedenfalls ist eine Veränderung in dem Verhalten des Lymphantitoxins zum Gift nicht nachgewiesen. Wir haben danach keine Veranlassung, anzunehmen, dass bei dem Uebergang aus dem Blute in die Lymphe das Antitoxin eine Veränderung erleidet.

Die Versuche Metschnikoff's¹⁾ haben gezeigt, dass das Tetanusgift sich lange in dem Blute von Kaltblütern aufhalten kann, ohne Tetanus hervorzurufen. Die in meiner Arbeit berichteten Thatsachen beweisen weiter, dass beim Hunde das Tetanusgift längere Zeit in der Lymphe verweilte, wahrscheinlich also in unmittelbarer Berührung mit den Gewebszellen, ohne gleich Tetanus hervorzurufen. Jeder der beiden mit Gift behandelten Hunde erhielt etwa vier Mal die tödtliche Minimaldosis für seine Grösse, und wenn in der Lymphe nur 500 + Ms in 1 ccm. vorhanden waren, so stand in nächster Nähe der Zellen mehr Gift, als zum Auslösen eines tödtlichen Tetanus genügen würde.

Fassen wir die Ergebnisse der Versuche kurz zusammen, so ersehen wir:

Nach Einbringen von Tetanusgift in die Blutbahn von Hunden trat ein beträchtlicher Theil des Giftes schnell in die Lymphe über.

War der Blut-Lymphkreislauf intact, so hatte sich das Gift nach etwa 26 Stunden annähernd gleichmässig in Blut und Lymphe vertheilt.

Wurde der Ductus thoracicus kurz vor der intravenösen Injection des Giftes geöffnet, so dass die Lymphe ununterbrochen nach aussen floss, dann blieb der Giftwerth des Blutes wenigstens bis zu 6 Stunden nach der Injection deutlich höher als der der Lymphe.

Während der allmählichen Verminderung des Giftwerthes, welche nach dem Erreichen der Maxima bei der Lymphe wie bei dem Blute stattfand, blieb das Giftverhältniss der beiden

1) Metschnikoff, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1897, S. 801.

Flüssigkeiten zu einander, bei nach aussen fliessender Lymphe, bis zur 6. Stunde nach der Giftinjection ohne auffallende Veränderung.

Nach Einbringen von Tetanusantitoxin (Pferdeserum) in die Blutbahn von Hunden fing das Antitoxin bald an in die Lymphe überzutreten.

Bei geöffnetem Ductus thoracicus behielt das Blut wenigstens bis zu 6 Stunden nach der Injection etwas mehr Antitoxin, als in die Lymphe übergegangen war.

Bei intactem Ductus thoracicus hatte 68 Stunden nach der intravenösen Injection des Antitoxins eine gleichmässige Vertheilung zwischen Blut und Lymphe nicht stattgefunden, sondern das Blut enthielt beträchtlich mehr Antitoxin als die Lymphe.

Weder bei dem Gifte noch bei dem Antitoxin war eine auffallende Veränderung nach dem Uebergang vom Blute zur Lymphe nachzuweisen. Somit wäre der Schluss gerechtfertigt: Das Tetanustoxin verhält sich nach Einführung in die Blutbahn von Hunden wie die normalen anorganischen Bestandtheile des Blut-Lymphkreislaufs, indem es sich nach einer gewissen Zeit gleichmässig zwischen Blut und Lymphe vertheilt. Das Tetanusantitoxin (Pferdeserum) dagegen unter denselben Bedingungen bleibt in Ueberschuss im Blute, verhält sich also wie die Proteinstoffe des Blut-Lymphkreislaufs.

Galaktosamin, ein neuer Amidozucker, als Spaltungsprodukt des Glykoproteids der Eiweissdrüse des Frosches.

Von

Fr. N. Schulz und Fritz Dittborn.

(Aus dem physiologischen Institut Jena [chemische Abtheilung]).

(Der Redaction zugegangen am 25. März 1900.)

Die durch die Untersuchungen von Pavy in Fluss gebrachte Frage, ob und welcher Kohlehydratcomplex als normaler Bestandtheil des gewöhnlichen Eiweissmoleküls anzusehen sei, beansprucht von den verschiedensten Gesichtspunkten aus ein hervorragendes Interesse. Den besten Beweis hierfür liefert eine Litteraturzusammenstellung, die jüngst Blumenthal¹⁾ gegeben hat, aus welcher ersichtlich ist, dass nicht weniger als 15 verschiedene Autoren sich in den letzten Jahren mit diesem Gegenstand beschäftigt haben. Diese stattliche Zahl zeigt ausserdem zur Genüge die Schwierigkeit, welche einer Lösung dieser Frage entgegensteht.

Der eine von uns hat schon vor längerer Zeit versucht,²⁾ ob sich nicht an Eiweisskörpern, deren Molekül offenbar sehr reich an Kohlehydrat liefernden Gruppen ist, zunächst rein methodisch, dann aber auch sachlich, günstige Vergleichsobjecte für die gewöhnlichen relativ kohlehydratarmen Proteine gewinnen liessen. Als Fr. Müller,³⁾ zum Theil vom gleichen Gesichtspunkte ausgehend, bei der Untersuchung des Schleim-

1) Deutsche medicin. Wochenschrift 1899. Nr. 49-50.

2) Nicht publicirte Untersuchungen.

3) Sitzungsberichte der Gesellsch. z. Beförd. der ges. Naturwissenschaften zu Marburg, 1896, Heft 6; 1898, Heft 6.

stoffs der Respirationsorgane des Menschen, eines sehr kohlehydratreichen Eiweissstoffes, so günstige Resultate erzielte, wandten wir uns gemeinsam der Untersuchung derartiger Körper zu, die zum Theil anscheinend noch kohlehydratreicher und ausserdem leichter zugänglich sind, wie die von Fr. Müller untersuchten Stoffe.

Wir beabsichtigten zunächst, das von Hammarsten¹⁾) beschriebene «Glykoproteid der Eiweissdrüse von *Helix pomatia*» vorzunehmen. Dasselbe ist aber ein sehr kostbares Material (1200 Schnecken lieferten uns nur 75 g gereinigtes Glykoproteid), so dass wir froh waren, als wir in dem Schleimstoff, welcher die Hülle des Froscheis bildet, ein leichter zugängliches, anscheinend ebenso günstiges Material fanden.

Dieser Schleimstoff ist anscheinend bisher nur von Giacosa²⁾) einem genaueren Studium unterzogen worden, jedoch sind die chemischen Daten über denselben nicht sehr eingehend. Er fand, dass die Hülle des Froscheis so gut wie ausschliesslich aus einem mucinartigen Körper besteht, der sich in Kalkwasser löst und aus dieser Lösung durch Essigsäure wieder gefällt wird. Das so gefällte Mucin, mit verdünnter Essigsäure, Alkohol, Aether gewaschen und filtrirt, hatte die Zusammensetzung:

C 52,89 H 7,15 N 9,24 S 1,32. Asche 0,62%.

Auch aus der Eiweissdrüse des Frosches, in welcher die Hüllen der Eier sich bilden, konnte Giacosa diesen mucinartigen Körper in ganz analoger Weise gewinnen. Die Zusammensetzung desselben:

C 50,98 H 7,24 N 6,679,

war also nicht unerheblich von dem vorher beschriebenen abweichend.

Weder in der Schleimhülle des Eies noch in der Eiweiss-

1) Pflüger's Archiv, Bd. XXXVI.

2) P. Giacosa, Etudes sur la composition chimique de l'oeuf et de ses enveloppes chez la grenouille commune. Diese Zeitschr. Bd. VII, S. 40—56. 1882.

drüse selbst fand er eine reducirende Substanz vorgebildet, dagegen wurde durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure leicht ein starkes Reduktionsvermögen hervorgerufen. Eine Erforschung der sich hierbei bildenden Substanz wurde nicht vorgenommen.

In der Schleimhülle konnte Giacosa kein anderes Eiweiss ausser dem Mucin nachweisen.

Dieser Schleimstoff steht offenbar dem von Hammarsten beschriebenen Glykoproteid der Eiweissdrüse von *Helix pomatia* am nächsten, und wir wollen ihn im Nachfolgenden denn auch als Glykoproteid bezeichnen. Beide Stoffe haben einen grossen Kohlenhydratgehalt, was sich in dem niedrigen Stickstoffgehalt und dem ausserordentlich grossen Reduktionsvermögen nach dem Kochen mit Säure äussert. Beide Substanzen werden im Gegensatz z. B. zu dem gewöhnlichen Schneckenmucin sehr rasch durch Säure gespalten; ein kurzes Aufkochen mit Säure genügt, um starke Reduction hervorzurufen, während bei dem gewöhnlichen Schneckenmucin stundenlanges Kochen viel geringere Mengen reducirender Substanz abspaltet. Beide Körper sind phosphorhaltig.

Wir haben einige Darstellungen des Glykoproteids unternommen. Wir gingen fast ausschliesslich von der ausgeschnittenen Eiweissdrüse aus und benutzten als Lösungsmittel sehr verdünnte Natronlauge ($\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ 0/0). Hierbei muss man sehr vorsichtig sein; da die Natronlauge leicht reducirende Substanzen abspaltet, muss man namentlich jedes Erwärmen mit Lauge vermeiden. Es ist zweckmässig, die Drüsen zunächst mit reichlich Wasser verquellen zu lassen, da sie sich dann nach Zusatz von Natronlauge leicht und fast vollständig auflösen. Beim Ansäuern mit Essigsäure wird die vorher schleimige, fadenziehende Lösung gallertig, ohne dass es zu einer ausgesprochenen Fällung kommt. Eine solche wird hervorgerufen durch Zusatz des gleichen Volums Alkohol; sie lässt sich leicht abfiltriren und dann mit Wasser waschen. Dieselbe wurde nochmals in Alkali gelöst, durch Essigsäure und gleiches Volumen Alkohol gefällt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und bei 100° getrocknet.

Präparat I.	Stickstoffgehalt (nach Dumas)	9,4%
„ II.	„ „ „	7,8%
„ III.	„ „ „	8,8%

Präparat III. C- und H-Bestimmung:
 0,2096 g lieferten 0,3376 g CO_2 und 0,1138 g H_2O .
 C 43,92% H 6,03%.

Es zeigte sich, was eigentlich zu erwarten war, dass auf diese Weise Präparate von constanter Zusammensetzung nicht zu erhalten waren. Das so dargestellte Glykoproteid gibt deutliche Biuret-, und Xanthoprotein-Reaction, dagegen keine Millon'sche Reaction.

Da es uns weniger auf das Glykoproteid als Ganzes, wie auf den abspaltbaren Zucker ankam, verzichteten wir in der Folge auf eine Darstellung dieses Glykoproteids und verwandten zu unseren Untersuchungen die ganze ausgeschnittene Eiweissdrüse von *Rana temporaria*. Wir waren hierzu berechtigt, da diese Drüse, wie auch schon Giacosa angibt, von vornherein keinen reducirenden Zucker enthält und ausser dem Glykoproteid kein nachweisbares Eiweiss. Der Versuch, einen glykogenartigen Körper aus der Eiweissdrüse zu gewinnen, hatte ein negatives Ergebniss. Die durch Behandeln mit Säure erhältlichen Kohlehydrate bezw. deren Abkömmlinge sind also als Spaltungsprodukte des Glykoproteids aufzufassen.

Bei der Darstellung des Zuckers konnten wir uns die von Fr. Müller und seinen Schülern durch mühsame Arbeit gesammelten Erfahrungen in ausgiebiger Weise zu Nutze machen. Fr. Müller¹⁾ verfährt im Wesentlichen in folgender Weise: Der zu untersuchende Stoff wurde einige Stunden mit verdünnter Säure gekocht, um die Spaltung zu vollziehen. Sodann wurde durch Benzoyliren nach Baumann-Schotten der Zucker abgeschieden.

Anfangs wurden nach dem Spalten mit Säure die Reste von Eiweiss, Albumosen etc. durch ein besonderes Gerbsäureverfahren abgeschieden und erst dann benzoylirt. Später wurde die «mühsame, zeit- und

¹⁾ Fr. Müller, Die Chemie des Mucins und der Mucoide. Sitzungsberichte der Gesellsch. z. Bef. d. Naturwissensch. Marburg, 1898, Nr. 6, S. 118.

materialraubende Entfernung der Eiweissstoffe» als «nicht nöthig» unterlassen. Genauer hierüber gibt Fr. Müller nicht an; er wird wohl in derselben Weise verfahren sein wie sein Schüler Seemann¹⁾ bei einer analogen Untersuchung des Eiweisses. Seemann neutralisirte nach dem Kochen mit Säure durch Natronlauge, filtrirte und benzoylirte das Filtrat nach entsprechender Verdünnung. In einer späteren Mittheilung,²⁾ welche sich mit dem aus der Colloidsubstanz der Eierstockcysten abspaltbaren Zucker beschäftigt, macht Müller wieder die Angabe, dass er erst «nach möglichster Entfernung der Eiweissstoffe bezw. Albumosen aus der Flüssigkeit» die Benzoylirung vorgenommen habe. Es scheint also, als ob die verschiedenen Materiale sich in dieser Hinsicht verschieden verhielten.

Das ausgeschiedene Benzoylprodukt, ein Gemenge verschiedener Benzoylirungsstufen, wurde in heissem Alkohol gelöst und dadurch zunächst von unlöslichen, aus dem Eiweiss stammenden Stoffen abgetrennt. Beim Erkalten krystallisirte ein Körper aus, der sich wiederholt aus heissem Alkohol umkrystallisiren liess und den Müller nach seiner Zusammensetzung als Pentaglykosamin bezeichnet. Das Wesentliche hierbei ist, dass es sich um einen stickstoffhaltigen Körper handelt. Durch Verseifen des Gemenges der verschiedenen Benzoylirungsstufen mit Salzsäure (spec. Gew. 1,100, im Einschmelzrohr 48 Stunden auf 110° erhitzt) konnte der freie Zucker gewonnen und zur Analyse gebracht werden. Derselbe erwies sich nach seiner Zusammensetzung und auch bei genauer krystallographischer Untersuchung als identisch mit dem salzsauren Glykosamin. Genau dieselben Verhältnisse, was die Benzoylirungsprodukte anbelangt, fand Müller³⁾ auch bei der Colloidsubstanz der Eierstockcysten, und Seemann³⁾ bei dem Eieralbumin und dem Ovomucoid.

Als wir in ganz analoger Weise die Eiweissdrüse

1) Seemann, Ueber die reducirenden Substanzen, welche sich aus Hühnereiweiss abspalten lassen. Inaug.-Diss. Marburg, 1898. (Auch im Arch. f. Verdauungskrankheiten abgedruckt.)

2) Fr. Müller. Ueber die Colloidsubstanz der Eierstockcysten. Separatabdruck aus den Verhandl. der Naturforsch.-Gesellsch. in Basel, Bd. XII, Heft 2. Eine ausführlichere Mittheilung wird angekündigt.

3) l. c.

von *Rana temporaria* behandelten, kamen wir zu wesentlich anderen Befunden.

Die ganzen Drüsen wurden durch 3stündiges Kochen mit 30/oiger Schwefelsäure oder 30/oiger Salzsäure gespalten,¹⁾ dann wurde mit Natronlauge neutralisirt, filtrirt und benzoylirt. Beim Benzoyliren rechneten wir so, dass wir mit einem reichlichen Ueberschuss von Benzoylchlorid arbeiteten und dabei die Menge der Flüssigkeit so wählten, dass sie, mit 10% Natronhydroxyd versetzt, zur Herstellung einer starken alkalischen Reaction genügte. Wir richteten uns dabei nach den von Baumann²⁾ selbst und von Kühny³⁾ angegebenen Mengenverhältnissen. Ein Beispiel möge erläutern.

5 Eiweissdrüsen vom Frosch = 70 g (Trockengewicht im Maximum 14 g = 20%; Annahme, nicht Bestimmung!) wurden mit 200 ccm. 30/oiger Salzsäure 3 Stunden am Rückflusskühler gekocht, dann wurde in der Schaafe auf 100 ccm. eingeeengt, nachdem mit Natronlauge bis zur eben sauren Reaction versetzt war. Nach dem Erkalten Zusatz von 50 ccm. 30/oiger Natronlauge. Dann wurde mit 20 ccm. Benzoylchlorid unter Kühlung geschüttelt bis zum Verschwinden des Geruchs nach Benzoylchlorid.

Das erhaltene Reactionsprodukt löste sich leicht in heissem Alkohol bis auf einen Rest (von der Eiweisscomponente herrührend), der überhaupt nicht in Alkohol löslich war. Aus dem Alkoholextract schied sich beim Erkalten und auch bei wochenlangem Stehen kein krystallinischer Niederschlag ab. Es fehlte also hier das alkoholschwerlösliche krystallisirende Benzoylprodukt Müller's. Trotz vielfacher Wiederholungen gelang es uns kein Mal, dasselbe zu erhalten, obschon wir die Vorschriften genau befolgten.

1) Die Drüsen lösen sich hierbei rasch, es bleibt jedoch ein feiner Niederschlag zurück, der dem Kochen mit Säure energisch widersteht. Dieser säureunlösliche Theil ist in Alkali glatt löslich, aus dieser Lösung durch Säure wieder fällbar. Dieser Niederschlag ist sehr reich an Phosphor. Vermuthlich handelt es sich also um Nucleinsäure. Dieselbe wurde vorläufig nicht untersucht. Das in oben beschriebener Weise isolirte Glykoproteid hat ebenfalls einen reichlichen Phosphorgehalt. Auch das Glykoproteid von *Helix promatia* ist ein Phosphorglykoproteid.

2) Baumann, Chem. Berichte Bd. 19. 3220.

3) Kühny, Zeitschrift für physiol. Chemie Bd. XIV, S. 330—371. 1889.

Wir versuchten nun auf andere Weise das Benzoylirungsgemenge in einheitliche krystallisirende Produkte zu zerlegen. Obschon es klar wurde, dass das Benzoylirungsprodukt aus einer Reihe krystallisirender Stoffe besteht, gelang es uns nicht, dieselben zu fassen. Es scheiterte dies an der Leichtlöslichkeit derselben. So konnte z. B. das Gesamtgemenge (durch Verdunsten der Alkohollösung gewonnen) durch Extraction mit Aether in einen aetherlöslichen und einen aetherunlöslichen Antheil geschieden werden. Beim Einengen des aetherischen Auszuges kam es nicht zu einer Ausscheidung (auch nicht in Kältemischung). Bei völligem Verjagen des Aethers hinterblieb ein öliger Rückstand, der beim Erkalten vollständig zu einer schön krystallinischen Masse erstarrte. Von einer Reinigung kann hierbei natürlich keine Rede sein, da sich keine Mutterlauge abtrennen lässt. Immerhin ist es von Interesse, dass der erhaltene Körper einen reichlichen Stickstoffgehalt aufwies. Derselbe betrug (nach Dumas bestimmt) 3,7%. Nur in einem Versuche schied sich aus der heissen alkoholischen Lösung der gesammten Benzoylirungsmasse beim Erkalten ein reichlicher Niederschlag ab. Dieser bestand aber aus öligen Tropfen und konnte auch durch mehrfaches Umfällen aus heissem Alkohol nicht in eine krystallinische Form gebracht werden.

Da es uns also nicht gelang, zu einem gut charakterisirten Benzoylprodukt zu gelangen, das uns in die Lage versetzt hätte, Schlüsse auf die Natur des zu Grunde liegenden Kohlehydrates zu machen, suchten wir aus dem in Alkohol gelösten Benzoylirungsgemenge den Zucker wieder abzuspalten und zu isoliren. Wir stiessen dabei nicht auf die grossen Schwierigkeiten, welchen Müller und auch Seemann bei dem gleichen Versuche begegneten. Immerhin ist die Ausbeute, die wir zu verzeichnen hatten, nur eine geringe, so dass wir vielleicht nur deshalb leichter zum Ziele gelangten, weil wir von reichlichen Mengen ausgehen konnten und Verluste nicht so sehr scheuen mussten.

Nachdem wir darauf verzichtet hatten, charakteristische Benzoylprodukte zu gewinnen, hielten wir uns auch bei

der Spaltung des Glykoproteids nicht mehr genau an die Angaben Müller's. Nachfolgende Darstellung möge zeigen, in welcher Weise wir verfahren.

5 Eiweissdrüsen + 50 ccm. Alkohol + 50 ccm. Wasser + 50 ccm. conc. HCl eine Stunde am Rückflusskühler gekocht; fast vollständige Lösung; schwarzbraune Färbung. Mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaction versetzt, auf 100 ccm. eingengt. + 50 ccm. 30%ige Natronlauge mit 20 ccm. Benzoylchlorid unter steter Abkühlung geschüttelt bis zum Verschwinden des Geruchs; fest geballte sehr reichliche Ausscheidung; decantirt. 2 Mal mit verdünnter Natronlauge gewaschen. Reactionsprodukt in 100 ccm. heissem Alkohol gelöst. + 50 ccm. Wasser + 50 ccm. Salzsäure 2 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Nach dem Kochen in viel Wasser (ca. 1 Ltr.) eingetragen, mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaction versetzt auf ca. 500 ccm. eingengt. Beim Erkalten schieden sich reichliche Mengen von Benzoesäure aus. (Ausserdem hinterblieb eine schwarze, zähe, bei 100° geschmolzene Masse, welche zum Theil ungenügend verseiftes Benzoylprodukt darstellte, denn bei Wiederholung derselben Behandlung konnten neuerdings nicht unbeträchtliche Mengen reducirenden Zuckers erhalten werden.) Das stark Fehling'sche Lösung reducirende Filtrat wurde weiter eingengt auf ca. 100 ccm. und von dem reichlich ausgeschiedenen Kochsalz abfiltrirt. Dieses Filtrat wurde weiter auf dem Wasserbade bis annähernd zur Trockne eingedampft. Sodann wurden die gesammten kochsalzreichen Rückstände mit heissem absoluten Alkohol in reichlicher Menge extrahirt, wodurch denselben die reducirende Substanz entzogen wurde. Der alkalische Auszug wurde abgedampft, und der Rückstand mehrmals mit absolutem Alkohol zur Entfernung des Kochsalzes aufgenommen, bis derselbe sich ohne Rückstand in absolutem Alkohol löste.

Der Rückstand stellte dann einen zähen Syrup dar, der im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure zu einer spröden Masse wurde, die aber an der Luft sofort wieder Feuchtigkeit anzog. Die Masse löste sich sehr leicht in Wasser, wobei Benzoesäure ungelöst zurückblieb. Die wässrige Lösung (ca. 100 ccm.) wurde mit Thierkohle entfärbt, filtrirt und nochmals mit Aether ausgeschüttelt, zur Entfernung der letzten Reste von Benzoesäure. Die wässrige Lösung reducirte Fehling sehr stark (1 ccm. Zuckerlösung = 3 ccm. Fehling, was bei Traubenzucker einem Gehalte von 1,5% entspräche). Die Lösung wurde in einem uns zur Verfügung stehenden Fleischl'schen Spectropolarimeter (von

Reichert, Wien) untersucht, wobei sie eine 3,4% Traubenzucker entsprechende Drehung zeigte. 48 ccm. der Lösung enthielten 0,69 Trockenrückstand = 1,2%.

Beim Einengen dieser Lösung schieden sich schöne millimeterlange Nadeln theilweise büschelförmig angeordnet aus. Schliesslich erstarrte die Masse zu einem Krystallbrei, der neben vereinzelt Kochsalzkrystallen überwiegend aus den oben beschriebenen Krystallnadeln bestand. Amorphe Ausscheidungen waren nicht vorhanden. Beim Trocknen im Vacuum über Schwefelsäure entstand eine spröde Masse, die aber an der Luft sofort wieder Wasser anzog und zähe, klebrig wurde. Der zur Constanz getrocknete Krystallbrei wog 0,69 g (s. vorher). Trocknen bei erhöhter Temperatur ist zu vermeiden, da sich dabei, wie anderweitig beobachtet, Braunfärbung einstellt, die übrigens beim Kochen der nunmehr gelben Lösung mit Thierkohle sofort verschwindet.

Von dem nicht weiter gereinigten, getrockneten Krystallbrei wurden zur Orientirung folgende Analysen gemacht.

0,243 g lieferten (Dumas) 15,0 ccm. N, (7° C., 739,5 mm. Hg) = 0,01770 g N = 7,28%

0,1977 g lieferten 0,131 g H₂O = 7,36% H.

0,1982 g CO₂ = 27,35% C.

0,215 g lieferten 0,1503 g Ag Cl = 0,0372 g Cl = 17,3% Cl.

0,0345 g lieferten 0,0021 g Asche = 6,1% (als NaCl berechnet).

C ₆ H ₁₂ NO ₆ · H Cl	berechnet	gefunden
Salzsaures Glykosamin	C 33,41	29,88
„ „ H	6,5	8,33
„ „ N	6,5	8,25
„ „ Cl	16,5	14,5
„ „ O	37,09	39,02.

In Anbetracht der mangelhaften Reinigung des analysirten Präparates, stimmen die gefundenen Werthe hinreichend für die Annahme, dass es sich um einen Amidozucker handelt von der Zusammensetzung des Glykosamins. Das isolirte Kohlehydrat ist nicht identisch mit dem salzsauren Glykosamin, denn dasselbe ist, auf die vorbezeichnete Weise gewonnen, ziemlich leicht löslich in absolutem Alkohol. Namentlich in der Hitze vermag derselbe grosse Mengen aufzunehmen, ohne

dieselben beim Erkalten wieder abzugeben. Auch aus der Natur der Oxydationsprodukte dieses Zuckers geht zur Evidenz hervor, dass derselbe mit dem salzsauren Glykosamin nicht identisch ist.

Auf die beobachtete stärkere optische Activität möchten wir keinen besonderen Werth legen, da die untersuchte Lösung nicht von analysenreinem Material hergestellt war.

Genau in derselben Weise wurde in einer ganzen Reihe von Fällen der vorher beschriebene Zucker isolirt. Es ist uns jedoch bisher nicht gelungen, diesen Zucker in solchen Mengen zu gewinnen, dass eine Reindarstellung durch Umkrystallisiren möglich war. Wir haben daher auch keine genaueren physikalische Daten für denselben feststellen können.

Wir haben noch von zwei Präparaten Stickstoffbestimmungen vorgenommen, um uns zu vergewissern, dass es sich thatsächlich um einen Amidozucker handelt. Präparat II bietet von den analysirten die meiste Gewähr der Reinheit. Dasselbe enthielt 6,3% N ($C_6H_{13}O_5N \cdot HCl = 6,5\% N$).

Von 25 Eiweissdrüsen ausgehend, wurde der Zucker durch Spaltung des Benzoylproductes dargestellt. Die wässerige Lösung des in der oben beschriebenen Weise nach Möglichkeit von Salzen sowie Benzoesäure gereinigten Zuckers wurde im Vacuum über Chlorcalcium bei 40° eingedampft. Bei zunehmender Concentration schied sich der Zucker in langen Nadeln aus; als eine hinreichende Menge sich abgeschieden hatte, wurde die Mutterlauge möglichst vollständig abgossen und der zurückbleibende Krystallbrei im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,089 g enthielten 0,0096 g Asche = 10,8%.

0,284 g = 0,2534 g organische Substanz lieferten 13,6 ccm. N
(7° C., 746 mm. Hg), also 0,0162 g N = 6,3%.

Präparat III enthielt 6,1% Stickstoff.

Hier wurde wieder wie bei Präparat I der Trockenrückstand einer nach Möglichkeit gereinigten Zuckerlösung analysirt.

0,0447 g Substanz lieferten 0,0024 g Asche = 5,4%.
0,5398 g Substanz = 0,5107 g organische Substanz lieferten 28,4 ccm. N
(12° C., 740 mm. Hg) = 0,0328 g N = 6,4%.

Wenn wir also auch bisher den aus dem untersuchten Schleimstoff isolirten Zucker als solchen nicht genügend charakterisiren konnten, so dass wir nur feststellen konnten, dass es sich um einen schön krystallisirenden, wasser- und

alkohollöslichen, also vom Glykosamin verschiedenen Amidozucker handelte, so gestattete uns doch die Untersuchung der Oxydationsprodukte dieses Zuckers ein Urtheil über die Natur des vorliegenden Körpers.

Das Glykosamin liefert bei der Oxydation mit Salpetersäure Isozuckersäure, eine in Wasser und Alkohol leicht lösliche Substanz, deren Krystalle bei 185° schmelzen. Fr. Müller macht keine besonderen Angaben, wie sich die von ihm untersuchten Substanzen gegenüber einer Oxydation mit Salpetersäure verhalten. Nur in seiner ersten Arbeit, in der es ihm noch nicht gelungen war, festzustellen, dass der aus dem Mucin abspaltbare Zucker mit dem salzsauren Glykosamin identisch ist, macht er zur Charakterisirung des erhaltenen Zuckers die Bemerkung, dass er bei der Oxydation mit HNO_3 weder Zuckersäure, noch Isozuckersäure, noch Schleimsäure erhalten habe. Späterhin werden keine derartigen Versuche mehr erwähnt.

Im Gegensatz zu diesen Befunden konnten wir durch Oxydation mit Salpetersäure reichliche Mengen von Schleimsäure gewinnen. So konnten wir aus 10 Eiweissdrüsen vom Frosch 0,7 g Schleimsäure gewinnen; in Anbetracht der unvermeidlichen grossen Verluste eine respectable Menge.

Versuch I.

10 Eiweissdrüsen vom Frosch wurden mit 200 ccm. Salpetersäure (specifisches Gewicht 1,15) bis zur heftigen Stickoxydentwicklung gekocht. Nach dem Erkalten wurde von dem reichlichen Niederschlage¹⁾ abfiltrirt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade auf ca. 20 ccm. eingengt. Beim Erkalten erstarrte dasselbe zu einem dicken Krystallbrei. Von demselben wurde die Mutterlauge abgesaugt, der Rückstand mit kaltem Wasser gewaschen und dann in reichlich heissem Wasser gelöst und filtrirt. Beim Erkalten und längerem Stehen schied sich ein reichlicher Niederschlag aus, der in der Form mit dem analogen von reiner Schleimsäure identisch war. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen. Derselbe wog getrocknet 0,75 g.

Der Schmelzpunkt schwankte zwischen 214 und 216° (nicht corrigirt). Für Schleimsäure ist 215° als Schmelzpunkt

1) S. Seite 378, Anmerkung 1.

angegeben. Zur Sicherstellung wurde auch noch eine Elementaranalyse der erhaltenen Schleimsäure gemacht.

0,0255 g lieferten 0,0001 g Asche = 2%.

0,2322 g = 0,2275 g aschefrei lieferten 0,2838 g CO_2 = 34,02% C
(für Schleimsäure berechnet 34,28%).

0,1966 g = 0,0927 g aschefrei lieferten 0,2316 g CO_2 = 32,77% C
und 0,0988 g H_2O = 5,7% H (für Schleimsäure berechnet 4,8%).

In einer zweiten und dritten Darstellung wurde Froschlaich von je einem Frosch verwandt. Es wurde zunächst kurze Zeit mit HNO_3 (1,15 spezifisches Gewicht) erwärmt, bis zur völligen Lösung der Schleims substanz. Dann wurde filtrirt und das Filtrat bis zu kleinem Volumen eingeeengt, bis beim Erkalten reichlichere Krystallausscheidung erfolgte. Diese Ausscheidung wurde abfiltrirt, mit Wasser und Alkohol gewaschen und in heissem Wasser gelöst. Beim Erkalten krystallisirte die Schleimsäure nach 24stündigem Stehen in prächtigen Krystallen aus. Die abgeschiedenen, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschenen Krystalle schmolzen jedesmal bei 214—216°, wie die vorher beschriebenen und analysirten Krystalle, mit denen sie auch im mikroskopischen Aussehen völlig übereinstimmten.

Da die Schleimsäure das Oxydationsprodukt der Galaktose ist, so sind wir zu dem Schlusse berechtigt, dass der von uns aus dem Froschglykoproteid isolirte neue Amidozucker ein Abkömmling der Galaktose ist, also ein Galaktosamin.

Wir wollen hier die Frage nicht erörtern, ob und in welcher Beziehung Glukose und Glykosamin zu einander stehen; bei unserem Galaktosamin scheinen die Verhältnisse einfacher zu liegen, indem dieser Amidozucker dasselbe Oxydationsprodukt gibt wie die Galaktose, während bekanntlich Glukose und Glykosamin verschiedene Oxydationsprodukte liefern.

Wir hoffen, bald weitere Mittheilung über das Galaktosamin machen zu können; hier sei nur noch erwähnt, dass es uns bis jetzt nicht gelungen ist, mit Hefe eine Vergährung desselben einzuleiten.

Die Beziehungen des Galaktosamins zum Glykoproteid bedürfen auch noch weiterer Aufklärung. Wenn in dem Glykoproteid eine einfache Vereinigung von Eiweiss mit Galaktosamin vorläge, so müsste das Galaktosamin mit seinem

Stickstoff an dem Eiweisscomplexe anhaften und dieser Stickstoff müsste zugleich ein integrierender Bestandtheil des Eiweissmoleküls sein. Auf andere Weise liesse es sich dann nicht erklären, dass der Stickstoffgehalt des Glykoproteids den des Galaktosamins nur unwesentlich überragt. Eine andere, noch zu prüfende Möglichkeit wäre die, dass das Glykoprotein in Eiweiss, Galaktosamin und einen anderen, vorläufig unbekannten, stickstofffreien oder -armen Complex zerfiel. Der Umstand, dass das Glykoprotein anscheinend reichliche Mengen Nucleinsäure liefert, ist für diese Ueberlegung ohne Bedeutung, da die Nucleinsäure annähernd denselben Stickstoffgehalt, wie das Eiweiss hat.

Auch bei den von Fr. Müller untersuchten Glykosiden ist einer derartigen Ueberlegung Rechnung zu tragen. Wenn Müller z. B. bei seinem Bronchialmucin einen Stickstoffgehalt von 10,7% findet,¹⁾ so würden, falls dasselbe eine Vereinigung von Eiweiss (zu rund 16% N) mit Glykosamin (7,8% N) darstellte (ohne dass der Stickstoff des Glykosamins am Aufbau des Eiweissmoleküls theilhaftig ist), sich 60 Theile Glykosamin mit 40 Theilen Eiweiss vereinigt haben müssen. Fr. Müller fand jedoch nur bis zu 36,9% Zucker im Mucin (aus dem Reduktionsvermögen berechnet)²⁾. Der Kohlenstoffgehalt musste (für Eiweiss 54% C angenommen) in einer Verbindung von 60 Theilen Glykosamin mit 40 Theilen Eiweiss 45,6% C betragen, während das Bronchialmucin 48,26% C enthält. Das gefundene Reduktionsvermögen, C- und N-Gehalt stehen jedoch im besten Einklang, wenn man annimmt, dass der N des Glykosamins zugleich an der Constitution der Eiweisscomponente theilhaftig ist.

Wir haben unsere Untersuchung auch auf das Glykoprotein der Eiweissdrüse der Schnecke ausgedehnt und hoffen auch hierüber bald Mittheilung machen zu können.

Jena, 23. März 1900.

1) Ein maximaler Werth.

2) Marburger Sitzungsberichte. 1896. S. 65.

Die organischen Substanzen der Schalen von *Mytilus* und *Pinna*.

Von

G. Wetzel,

Assistent am physiologischen Institut.

(Aus dem physiologischen Institut zu Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 7. April 1900.)

Unter Systematik sind wir gewohnt, eine Anordnung der Geschöpfe nach den Eigenthümlichkeiten ihrer Gestalt zu verstehen. Ich bezweifle nicht, dass für praktische Zwecke dies das allein mögliche Princip ist. Aber wir könnten uns auch eine Klassifikation auf Grund des Vorkommens bestimmter Stoffe oder des Auftretens bestimmter Arten stofflicher Umwandlungen denken. In der Systematik der Spaltpilze spielen derartige Principien eine nicht unbedeutende Rolle. So das Verhalten der Bakterien zu verschiedenen Farbstoffen, ihr Verhalten zu dem Nährboden, und die Anforderungen, die sie an denselben stellen.¹⁾ Bei der systematischen Verwerthung von Differenzen in chemischen Vorgängen ist indessen die grösste Vorsicht geboten. Viele scheinbar charakteristische Erscheinungen sind nur von äusseren Bedingungen abhängig und wechseln mit ihnen. So schien die grössere Widerstandsfähigkeit des Hundes gegen die Folgen von Säurezufuhr gegenüber der des Kaninchens in der Organisation des Hundes begründet zu sein. Sie war aber nur eine Folge der Fleischnahrung und der mit Pflanzennahrung gefütterte Hund verhält sich wie das Kaninchen. Ebenso wechselt die Pigmentproduktion von Bakterien mit ihren äusseren Existenzbedingungen.

¹⁾ Flügg e, Mikroorganismen. Bd. II.

Hoppe-Seyler¹⁾ hat für den Satz, dass die Ontogenie gleich der Phylogenie ist, auf Bestätigungen in der Chemie der Organismen hingewiesen. Er sagt: «Geht man die Zusammensetzung der Gewebe vergleichend von den niedriger organisirten zu den höher entwickelten Thieren fortschreitend durch, so findet man zuerst das Auftreten von mucingebendem Gewebe, dann bald chondringebendem, endlich auch in den Cephalopoden das Auftreten von glutinegebendem Gewebe.» «Ganz dieselbe Reihenfolge ergibt sich, wenn man die Stadien der Entwicklung eines Embryo, z. B. des Hühnchens im Ei, verfolgt, und ich kann mir nicht denken, dass diese Uebereinstimmung nur eine zufällige sei.» — Ebenso weist Hoppe-Seyler darauf hin, dass die morphologische Klassifikation der Organismen durch eine Berücksichtigung ihrer chemischen Eigenthümlichkeiten eine Ergänzung erfahren könne.

Die hiermit in grossen Zügen angedeuteten Gebiete zur Verwerthung der Resultate der physiologisch-chemischen Forschung bedürfen zu ihrer näheren Kenntniss noch einer eingehenden Untersuchung aller in den verschiedenen Klassen des Thierreichs vorkommenden gewebusbildenden Substanzen. Die endgültige Entscheidung darüber, ob aus den chemischen Eigenthümlichkeiten der Geschöpfe sich Gesetzmässigkeiten ableiten lassen, welche mit den auf morphologischem Gebiete gefundenen parallel gehen, wird sich erst dann sicher treffen lassen.

In dem hier angedeuteten Sinne möchte ich die in Folgendem mitgetheilten Untersuchungen über das Conchiolin in erster Linie aufgefasst sehen.

Ich musste meinen Untersuchungen aus äusseren Gründen einen Abschluss geben. Daher sah ich mich gezwungen, manche Theile, vor Allem die Erörterung über die Stellung des Conchiolins unter den Albuminoiden und im Zusammenhange damit die Frage nach seinem Schwefelgehalt, auf dem Punkte stehen zu lassen, auf dem sie sich gerade befanden, ohne sie zu einem sicheren definitiven Ende führen zu können.

1) Pflüger's Archiv. Bd. 14. 1877. S. 400.

Unsere gegenwärtigen Kenntnisse über das Conchiolin beruhen auf den älteren Untersuchungen von Fremy, Kost, Schmidt, Schlossberger und C. Voit, sowie auf den neueren von Krukenberg und Engel.

Fremy hat (nach Schlossberger) die Bezeichnung Conchiolin für die organische Gerüstsubstanz der Lamelli-branchiaten eingeführt. Später stellte zunächst Schlossberger¹⁾ fest, dass das Conchiolin mit Chitin, wofür es damals gehalten wurde, nichts zu thun habe. Der Stickstoffgehalt des Chitins beträgt nach ihm 6,5%, der des Conchiolins über 16%.

Einen Fortschritt in der Erkenntniss der Stellung des Conchiolins bildete ferner die Untersuchung C. Voit's²⁾ welcher unter anderen Thatsachen feststellte, dass das Conchiolin aus den Schaaalen der Perlmuschel sich mit Millon's Reagens roth färbte. Voit behandelte den nach der Entkalkung der Schaaalen erhaltenen Rest mit verdünnter Kalilauge in der Kälte und stellte mit dem darin unlöslichen Antheil die genannte Reaction an.³⁾

Hiermit stellten sich später die Untersuchungen Krukenberg's⁴⁾ in Widerspruch. Dieser Forscher gab an, dass das Conchiolin keine Rothfärbung mit Millon'schem Reagens gäbe, und dass sich unter seinen Zersetzungsprodukten kein Tyrosin befände. Diese Angaben erklären sich vielleicht dadurch, dass Krukenberg als Conchiolin einen Stoff untersucht hat, der die Eihüllen der Murexeier bildet. Er nennt diesen Stoff ein sehr reines Conchiolin. Die Eihüllen behandelte er mit Salz-

¹⁾ Schlossberger, Chemie der Gewebe. Leipzig u. Heidelberg 1856.

²⁾ Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoologie. Bd. X. 1860.

³⁾ Bei Voit und bei Schlossberger findet sich auch die übrige ältere Litteratur citirt.

⁴⁾ Zeitschr. f. Biologie. Bd. 22. Berichte d. d. ch. G. Bd. XVIII. Vergl. Physiologische Vorträge. Heidelberg 1885.

Anmerkung. Wie ich nachträglich sehe, hat Simroth neuerdings den Vorschlag gemacht, die Bezeichnung Conchiolin durch «Conchin» zu ersetzen. Zoolog. Anz. Bd. 20. S. 471.

säure, unterwarf sie der Pepsin- und der Trypsinverdauung und der Maceration in verdünnter Natronlauge. Diese Vorbehandlung entspricht also mit Ausnahme der Verdauungen dem Verfahren Voit's. Krukenberg war ausserdem der erste, welcher die Zersetzungsprodukte seines Conchiolins studirte. Er gibt an, nur Leucin und Leucinimid nebst einem in klaren Prismen krystallisirenden unbekannten Körper gefunden zu haben. Das Auftreten von Tyrosin und Glykokoll stellt er in Abrede.

Die Eischaalen von Murex wurden später noch einmal von Engel¹⁾ untersucht. Er fand, dass sie nach der Behandlung mit den verschiedensten Reagentien stets noch Rothfärbung mit Millon'schem Reagens gaben. Er kam schliesslich zu dem Resultat, dass die Murexeischaalen einen schwefelhaltigen keratinartigen und ausserdem einen schwefelfreien Stoff enthalten. Von dem letzten gibt er die Möglichkeit zu, dass er mit dem Conchiolin Krukenberg's identisch sein könne. Er gab aber ebenfalls noch Rothfärbung mit Millon's Reagens. Schliesslich bestätigt Engel noch die Angaben Voit's, dass auch das Conchiolin in der Perlmuschel diese Reaction gäbe. Die Zersetzungsprodukte des Conchiolins hat Engel nicht untersucht.

Die Lehrbücher der physiologischen Chemie von Hammarsten und von Neumeister, sowie das Handbuch von Hoppe-Seyler geben an, dass das Conchiolin keine Rothfärbung mit Millon'schem Reagens gäbe. Auch in Gautier's «Leçons de chimie biologique»²⁾ wird das Eintreten der Rothfärbung verneint. Ebenso fehlt nach Angabe dieser Werke das Tyrosin unter den Zersetzungsprodukten. Nach Gautier soll Glykokoll sich darunter befinden, während die übrigen Lehrbücher nur Leucin angeben. Ich weiss nicht, auf welche Litteraturangabe diese Angabe Gautier's zurückgeht oder ob sie auf eigener Untersuchung beruht. Gautier bemerkt ausserdem, dass er etwas Schwefel im Conchiolin gefunden habe.

1) Zeitschr. f. Biologie. Bd. 27, S. 374 u. Bd. 28, S. 345.

2) Paris 1897.

Das Material für meine eigenen Untersuchungen habe ich auf der zoologischen Station zu Neapel gesammelt und die Arbeit in dem chemischen Laboratorium der Anstalt begonnen. Für die reichliche Versorgung mit dem hier verarbeiteten wie mit vielem andern Material bin ich Herrn Dr. Lo Bianco zu grossem Danke verpflichtet. Ebenso gebührt mein Dank dem damaligen Leiter der physiologischen Abtheilung, dem verstorbenen Physiologen K. Schönlein. Es entspricht seinem ausdrücklichen Wunsche, wenn ich hier darauf hinweise, dass der physiologische Chemiker in der Station in der Villa nazionale ein gut ausgerüstetes chemisches Laboratorium vorfindet, welches ihm die vollständige Ausführung chemischer Arbeiten gestattet. Der Aufenthalt in Neapel wurde mir durch ein Stipendium aus der Gräfin Luise Bose-Stiftung ermöglicht, Der preussischen Regierung bin ich wegen der Ueberlassung eines Arbeitsplatzes an der Station zum grössten Danke verpflichtet.

Als Object für meine Untersuchungen habe ich hauptsächlich die Schalen von der Miesmuschel, *Mytilus edulis*, und zwar der im Mittelmeer lebenden Varietät *galloprovincialis* und die Schalen der riesigen rothen Steckmuschel, *Pinna nobilis*, verwendet. Daneben dienten die Eischalen verschiedener Schnecken zur Untersuchung. Jedoch wurde durch diese die Arbeit nur wenig gefördert, da es nicht möglich war, sie in so grosser Menge zu beschaffen wie die Schalen der Muscheln. Dies musste aber für die Untersuchung der Zersetzungsprodukte, an der mir in erster Linie gelegen war, zur Vorbedingung gemacht werden.

Die Mytilusschalen bestehen aus mehreren, durch ihre Struktur unterschiedenen Schichten, welche einen organischen Rest von verschiedenem Aussehen liefern, wenn man sie mit Salzsäure entkalkt. Ist es nun richtiger, den gesammten organischen Rest ohne Sonderung der einzelnen Bestandtheile zu untersuchen oder das Conchiolin jeder morphologisch einheitlichen Substanz für sich zu sammeln? Ich habe mich, was die Untersuchung der Spaltungsprodukte anbelangt, für die Untersuchung des Gesamtrestes entschieden und zwar deswegen,

weil hierzu eine grössere Menge Substanz unerlässlich ist, deren Beschaffung ausserordentliche Schwierigkeiten machen würde, wenn man die einzelnen Bestandtheile der Schaafe sondern und für sich sammeln wollte. Ferner ist die Perlmuttersubstanz, für welche sich am ehesten die Möglichkeit einer Verschiedenheit von der übrigen Schaafe eröffnet, verhältnissmässig nur in sehr geringer Menge vorhanden. Bei der Untersuchung der Spaltungsprodukte sind also diese, soweit sie in grösserer Menge sich finden, auf die Hauptmasse der Schaafe substanz zu beziehen.

Ausserdem aber habe ich von einer kleinern Menge von Schaafe die einzelnen Substanzen gesondert, um sie für sich einer orientirenden Untersuchung zu unterziehen. Die Resultate dieser Untersuchung will ich der der Spaltungsprodukte voraufschicken.

Aus den Schaafe von Pinna erhält man zwei verschiedene Produkte. Die Grundsubstanz ihres roth gefärbten Hauptantheiles bildet nach der Entkalkung ziemlich feste, zusammenhängende Häute oder Lappen, welche ein Fachwerk darstellen. Die Hohlräume der Häute enthielten vorher die Hauptmasse des kohlensauren Kalkes. Ausser diesem Produkt gewinnt man ein weisses, sehr viel feineres und nicht so zusammenhängendes aus der Perlmuttersubstanz. Diese weissen Flocken werden in viel geringerer Menge erhalten. Die Analysen beider Schaafe ergaben gewisse Unterschiede.

Die zur Analyse verwendeten rothen Häute wurden nach der Entkalkung noch 24 Stunden mit einer etwa 1^o/oigen Lösung von Natronhydrat in der Kälte behandelt und nacheinander der Verdauung mit Pepsinsalzsäure und mit Pankreassaft unterworfen. Bei diesen Prozeduren ging eine geringe Substanzmenge in Lösung, welche nicht quantitativ bestimmt worden ist. Die so vorbehandelte Substanz wurde dann mit Alkohol und mit Aether extrahirt und getrocknet. Die Perlmuttersubstanz wurde nach der Entkalkung und nachdem sie kalkfrei gewaschen war, sogleich mit Alkohol und Aether behandelt. Die Unterschiede in der Behandlung beider Substanzen dürften kaum hinreichen, um die Verschiedenheiten in

der Zusammensetzung zu erklären, welche sich in den folgenden Analysenresultaten zeigen.

Bei 1250—1300 getrocknet und aschefrei berechnet	{	Roths Conchiolin	52,97 % C	6,54 % H
		Weisse Perlmutter-		
		grundsubstanz	51,1	5,97

Im Stickstoffgehalt fand sich kein Unterschied. Der hauptsächlichste Unterschied liegt im Kohlenstoffgehalt. Beide Substanzen enthielten ausserdem Schwefel. Sie gaben bei der Schön'schen Schwefelprobe eine Violettfärbung mit Nitroprussidnatrium. Der Schwefel im rothen Conchiolin wurde auch quantitativ bestimmt. Die rothen Schaaalen hinterliessen auf dem Platinbleche einen beträchtlichen Ascherückstand, welcher bestimmt und zu 1,76% gefunden wurde. Die weisse Substanz enthielt nur sehr geringe Spuren von Asche, welche auf das Analysenresultat von keinem merklichen Einfluss sein konnten. Als Resultat ergibt sich also, dass das Perlmutterconchiolin einen geringeren Kohlenstoffgehalt besitzt als das rothe Conchiolin.

Die Mytilusschaalen geben drei verschiedene Häute. Wird eine Schaaale von Mytilus vollständig entkalkt, so stellt sie ein schlaffes Gebilde dar, welches die Form der harten Schaaale noch leidlich beibehalten hat. In der spitzen Hälfte befindet sich an der Innenseite ein Häufchen weisser, lockerer Masse. Diese stammt aus der Perlmuttersubstanz der Schaaale. Das Uebrige besteht aus zwei gleich grossen Häuten, einer äusseren und einer inneren, welche sich leicht von einander abziehen lassen. Die innere ist gleichmässig dunkelbraun gefärbt. Auf ihrer Oberfläche sitzen noch Theile der weissen Substanz, welche daran so fest haften, dass sie sich nicht wohl entfernen lassen. Die äussere Haut zeigt concentrische, abwechselnd tief dunkel und etwas heller gefärbte Ringe. An den helleren Stellen ist sie mit bräunlich-gräulicher Farbe durchscheinend. Sie ist sehr fest gegenüber der inneren Haut. Von den drei Häuten lassen sich mithin als einheitlich nur die äussere dunkle und die Perlmuttersubstanz ansehen. Von der Untersuchung der innern dunklen Haut, welche noch mit Theilen der Perlmuttersubstanz verbunden ist, habe ich aus diesem Grunde

ganz abgesehen. Von der weissen Substanz erhielt ich aus 100 g Schaaalen nur annähernd 1 Decigramm. Mit dieser Menge habe ich keine Analyse gemacht. Die schwarzen äusseren Häute wurden mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat mit oxalsaurem Ammoniak keine Trübung mehr gab, dann mit Alkohol und mit Aether extrahirt, getrocknet und verrieben. Der Kohlenstoffgehalt dieser Substanz war ebenfalls beträchtlich höher als der der Perlmuttersubstanz von Pinna. Ein direkter Vergleich mit der Perlmuttersubstanz von Mytilus konnte nicht gemacht werden.

In den von Schlossberger und Voit untersuchten Schaaalen der Auster und der Perlmuschel finden sich ebenfalls Häute von verschiedener Beschaffenheit.

Die Schaaalen der Auster liefern nach Schlossberger¹⁾ zwei Arten von Substanzen, erstens «braune, derbe, etwas durchscheinende Häute» und zweitens «weisse oder weissgraue Flocken». Die letzteren stammen hier ebenfalls zum grossen Theil aus der Perlmuttersubstanz. Schlossbergers braune Häute würden der äussern und innern Haut zusammen entsprechen. Ueber die chemische Natur der beiden Häute nimmt er Folgendes an. In den braunen sind zwei Substanzen enthalten, eine in Kalilauge lösliche und eine darin völlig unlösliche Substanz. Die weissen Häute hält er für einen chemisch einheitlichen Körper, der dem löslichen Antheil der braunen Häute sehr nahe stehe. Die leichtere Löslichkeit der Perlmuttersubstanz in Alkalien und Säuren kann ich für Mytilus und Pinna bestätigen.

Die Perlmuschel liefert nach C. Voit²⁾ ebenfalls ein braunes und ein weisses Conchiolin, von denen sich das braune schwerer in Alkalien löst als die weissen Häute, er kommt jedoch zu dem Schluss, dass sie sich in ihrem chemischen Verhalten nicht wesentlich von einander unterscheiden.

1) Chemie d. Gewebe s. o.

2) Ztschrft. f. wissenschaftl. Zoologie Bd. X.

Zum Studium der Zersetzungsprodukte des Conchiolins mit Säuren habe ich ausschliesslich die Schaaalen von *Mytilus* verwendet. Wie oben schon auseinandergesetzt, wurde zu diesem Zwecke keine Trennung der einzelnen Arten von Häuten vorgenommen, sondern der gesammte organische Rest verwendet. Im Ganzen habe ich, um über grössere Substanzmengen verfügen zu können, etwa einen Centner Miesmuschelschaaalen entkalkt.

Die Schaaalen sind zum Theil mit den aus dem Byssusorgan stammenden gelben, sehr zähen Byssusfäden besetzt. Viele tragen auch die Gehäuse von Röhrenwürmern oder die Stöcke kleiner Hydroidpolypen oder die Gehäuse von Seepocken. Solche Schaaalen wurden ausgesondert und fortgeworfen. Die mit viel Byssus besetzten wurden für sich entkalkt, ebenso die davon mehr oder weniger freien. Wo der Byssus in einem dichten Knäuel aufsass, wurde er abgerissen und besonders gesammelt. Zur Entkalkung diente eine verdünnte Salzsäure, welche im Liter zwischen 5 und 10 ccm. concentrirter Salzsäure enthielt. Die Säure befand sich in grossen grünen Glasballons. Aus diesen wurde die verbrauchte Säure abgehebert und durch frische ersetzt, bis die Schaaalen nahezu vollständig entkalkt waren. Die gänzliche Entkalkung konnte an den nunmehr an Volumen sehr zusammengeschwundenen Massen in grösseren Glascylindern und Bechergläsern ausgeführt werden. Die vollständig entkalkten Schaaalen wurden in Leinenbeuteln ausgepresst, wiederholt in Leitungswasser suspendirt und wieder ausgepresst. Dies geschah so lange, als die Flüssigkeit noch sauer reagierte und ihr Kalkgehalt den des verwendeten Leitungswassers übertraf. Dann wurden die Schaaalen in derselben Weise mit destillirtem Wasser ausgewaschen, bis die Flüssigkeit mit Ammoniak und Ammoniumoxalat keine Fällung mehr gab.

An Stelle des Auspressens durch einen Beutel bediente ich mich in den späteren Stadien der Reinigung des Absaugens auf der Nutsche. Die Schaaalen sind nämlich zuletzt zum Theil schon in sehr feine Bruchtheile zerfallen, von welchen beim öfteren Auspressen durch Leinwand nicht unbeträchtliche Mengen

verloren gehen würden. Die feinsten Bruchstücke wurden auch zum Theil für sich gewonnen. Sie senken sich zu Boden und die grösseren können zunächst mit der Hauptmasse der Waschflüssigkeit auf das Filter gebracht werden. Die feinen Theile lässt man dann sedimentiren, wäscht durch Dekantiren aus und saugt sie schliesslich auch auf dem Filter ab. Grobe und feine Theile wurden natürlich schliesslich wieder vereinigt.

Die so gewonnene Masse bestand jetzt aus verschieden gefärbten Häuten, die noch eine ziemlich elastische Beschaffenheit zeigten und sich nur sehr unvollkommen in der Reibschale zerkleinern liessen.

Die Häute wurden nun zweimal mit Alkohol und einmal mit Aether je 24 Stunden stehen gelassen. Der Aether wurde abgesaugt und abgepresst und die Massen auf dem Wasserbade getrocknet. Jetzt erhielt ich eine ziemlich spröde Substanz. Sie liess sich bequem zu einem schwarzbraunen Pulver verreiben. Das Pulver stäubt leicht und besteht aus ganz feinen Theilchen und etwas grösseren Blättchen. Dazwischen befinden sich noch gelbliche Blättchen, die Anheftepünktchen der Byssusfäden. Ferner finden sich nun noch, besonders in der einen Hälfte der Präparate, die Byssusfäden selbst und einige grössere Verunreinigungen. Diese und die Byssusfäden lassen sich durch Sieben mittelst eines feinen Siebes abtrennen.

Ich erhielt also im Ganzen zwei Präparate. Das eine, reine, enthielt neben den Schalen nur wenig Byssus, das andere eine etwas grössere Menge dieser Substanz. Ausserdem enthielten sie noch hornige Ränder vom Scharnier der Schalen. Die gesammte Ausbeute betrug etwas mehr als ein halbes Kilo, also etwa 1% der verwendeten Schalenmasse.

Bisher habe ich nur 100 g von dem reineren Theil der Ausbeute zersetzt. Das übrige Material ist nur zum kleinen Theil für andere Bestimmungen und Untersuchungen verarbeitet. Von dem reineren Präparat habe ich eine vollständige Analyse gemacht. Sie ergab folgende Zahlen (für bei 125—130° getrocknete Substanz):

C	H	N	S
52,3 %	7,6 %	16,4 %	0,65 %

Die 100 g wurden 24 Stunden lang mit einer Schwefelsäure, welche auf 1 Theil Säure 2 Theile Wasser enthielt, am Rückflusskühler gekocht. Ein schwarzer pulveriger Bodensatz aus organischer Substanz, welcher nicht in Lösung gegangen war, wurde abfiltrirt. Auf die Untersuchung dieser Substanz werde ich unten zurückkommen. Darauf wurde die Flüssigkeit verdünnt und mit Phosphorwolframsäure zur Entfernung und Gewinnung der basischen Spaltungsprodukte gefällt.

Den Phosphorwolframsäure-Niederschlag habe ich mit Barythydrat zerlegt und aus dem Filtrat das Gemisch der Basen gewonnen, jedoch habe ich diesen Theil der Zersetzungsprodukte qualitativ nicht bearbeitet. Hingegen habe ich schon früher eine Bestimmung der Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs vorgenommen und publicirt.¹⁾

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde mit Barythydrat ausgefällt und sowohl die Phosphorwolframsäure als die Schwefelsäure entfernt. Den Ueberschuss von gelöstem Baryt entfernte ich aus der von den Baryumniederschlägen abfiltrirten Flüssigkeit durch genaues Neutralisiren mit Schwefelsäure.

Das eingedampfte Filtrat vom schwefelsauren Baryt schied beim Erkalten grosse Mengen weisser Krystallmassen aus, welche unter dem Mikroskop lange, zum Theil sternförmig zusammengelegte, zum Theil büschelig angeordnete Nadeln zeigten. Die heisse Lösung des Stoffes nahm Kupferoxydhydrat zu einer blauen Lösung auf, die sich beim Sieden trübte und eine schwarze Ausscheidung lieferte. Die Krystalle gaben intensive Rothfärbung mit Millon'schem Reagens. Es war zu erwarten, dass Tyrosin vorlag. Die Substanz enthielt zunächst noch ein wenig Asche, welche sich durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser bis auf sehr geringe Spuren entfernen liess. Von dem so gereinigten Präparat wurde eine Stickstoffbestimmung gemacht.

0,1536 g Substanz brauchten zur Neutralisation 3,61 ccm. einer $\frac{1}{4}$ Normalnatronlauge, von der 1 ccm 3,2115 mg N entsprach.

	$\frac{1}{4}$ N berechnet	$\frac{1}{4}$ N gefunden
Tyrosin	7,75	7,55

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI.

Danach dürfte das Vorhandensein von Tyrosin, welches Krukenberg in seinen Substanzen nicht gefunden hatte und welches man in Folge des Auftretens der Millon'schen Reaction unbedingt erwarten musste, erwiesen sein.

Die Menge des aus 100 g Substanz gewonnenen unreinen Tyrosins betrug etwa 5 g.

Die nach dem Auskrystallisiren des Tyrosins übrig bleibenden Amidosäuren habe ich im Wesentlichen nach dem Verfahren von Schulze¹⁾ behandelt. Ich bin von ihm insofern abgewichen, als ich statt des Kupferoxydhydrates Kupfercarbonat verwendet habe. Ich erhielt beim Kochen der Lösungen der Amidosäuren mit Kupfercarbonat stets klare blaue Lösungen, aus denen erst beim Erkalten mehr oder weniger auskrystallisirte. Hierdurch unterschieden sich die aus dem Conchiolin gewonnenen Amidosäuren sehr erheblich von Amidosäurenfractionen, welche gleichzeitig im Laboratorium aus Casein dargestellt worden waren und mit Kupferoxydhydrat erhitzt wurden. Es bildete sich hier schon in der heissen Lösung ein voluminöser Niederschlag.

Zunächst wurden aus den nach Entfernung des Tyrosins übrig bleibenden Amidosäuren so viel Krystallfractionen gewonnen, als daraus in der Kälte nach allmählich stärkerem fortgesetzten Eindampfen auskrystallisiren wollten. Es blieb schliesslich ein dicker Syrup übrig, welcher noch sehr viel Substanz enthielt. Diesen habe ich noch nicht genügend untersuchen können. Die durch Auskrystallisiren gewonnenen Fractionen wurden nun einzeln in ihre Kupfersalze verwandelt und diese fractionirt. Dabei wurden stets die Substanzen, welche etwa eine gleiche Löslichkeit zeigten, aus verschiedenen Fractionen mit einander vereinigt, um die Anzahl der Fractionen möglichst wenig zu erhöhen.

Schliesslich erhielt ich einerseits einige Fractionen, es waren die späteren, welche hauptsächlich nur ein einziges, in heissem Wasser leicht lösliches Kupfersalz enthielten. Es krystallisirte beim Erkalten in langen Nadeln aus. Die Krystalle zeigten mikroskopisch eine sehr gleichmässige Beschaffenheit.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 63 u. 253.

Die ersten Fractionen dagegen zeigten hier und da auch nadelförmige Krystalle, in der Hauptsache aber keine ausgesprochene Krystallform. Hier war also noch ein Gemisch vorhanden. Ich reinigte es jetzt nicht mehr durch Umkrystallisiren, sondern dadurch, dass ich die einzelnen Krystallfractionen abfiltrirte und mit wenig Wasser auskochte. Das Lösliche wurde stets vereinigt und ebenso das Unlösliche. Aus den gelösten Antheilen wurden durch Auskrystallisiren noch wieder unlösliche gewonnen und das ganze Verfahren noch einigemal wiederholt. So erhielt ich ziemlich rasch ein fast ganz unlösliches Kupfersalz. Es wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, wobei sich das Schwefelkupfer erst nach wiederholtem Eindampfen und neuem Zusatz von Wasser vollständig ausschied. Aus der abfiltrirten eingedampften Flüssigkeit krystallisirten grosse vielzackige Blättchen, welche in Drusen angeordnet waren. Die Krystalle waren in heissem Alkohol löslich und krystallisirten daraus beim Erkalten in schönen sechsseitigen Täfelchen, der Krystallform des reinen Leucins. Der Körper sublimirte beim Erhitzen im Reagensglase ohne Rest. Im Schmelzröhrchen verschwanden sie bei langsamem Erhitzen ebenfalls allmählich bis auf einen geringen braunen Rückstand, bei schnellem Erhitzen trat bei 170—171° Zersetzung und dann ebenfalls rasches Verschwinden ein. Der Stickstoffgehalt des Präparates wurde nach Kjeldahl bestimmt.

0,2142 g Substanz entsprachen 7,92 ccm. einer $\frac{1}{4}$ Normallauge, von der 1 ccm. 3,2115 mg N entsprach.

Leucin (Amidocaprinsäure)	% N berechnet	% N gefunden
	10,69	10,6

Das Leucin ist schon von Krukenberg unter den Zersetzungsprodukten des Conchiolins aufgefunden, jedoch nicht hinreichend sicher gekennzeichnet worden.

Die erhaltene Menge betrug rein nur einige Decigramm, auch die des unreinen Leucins war nur gering.

Wir wenden uns nun zu dem Kupfersalz der letzten Fractionen, welches die erwähnten langen Nadeln bildete. Das Kupfersalz wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Hierbei schied sich das Schwefelkupfer im Gegensatz zu den ersten

Leucinfractionen sofort vollständig aus und setzte sich gut unter der wasserhellen Flüssigkeit ab. Das eingedampfte Filtrat schied starke Prismen aus, welche zum Theil in Drusen angeordnet waren. Es konnten also Glykokollkrystalle sein.

Nach einmaligem Umkrystallisiren zeigte die Substanz folgende Eigenschaften. Sie bräunte sich beim Erhitzen von 225° an stark und begann sich unter Gasentwicklung bei 234 bis 235° zu zersetzen. Nach Hoppe-Seyler soll das Glykokoll sich bei 228° bräunen und bei 232—236° zersetzen. Ich habe dann noch das Thiohydantoïn des vermuthlichen Glykokolls dargestellt. 0,5 g des Körpers wurden mit 0,37 g Kalihydrat in Alkohol verrieben und zu einer alkoholischen Lösung von 0,9 g Phenylsenföl gesetzt. Beim Erwärmen auf dem Wasserbade entstand ein Brei, der abfiltrirt, in Wasser gelöst und mit HCl übersättigt wurde. Beim Erhitzen der Lösung schied sich das Thiohydantoïn aus. Es wurde abfiltrirt und sein Schmelzpunkt bestimmt. Es schwärzte sich von 200° ab zunehmend, ohne zu schmelzen und ohne Gasentwicklung, jedoch unter Bildung brauner Destillationsprodukte. Dies stimmt mit den Angaben Aschan's¹⁾ überein.

Schliesslich habe ich noch eine Stickstoffanalyse der freien Amidosäure und eine Krystallwasserbestimmung des Kupfersalzes ausgeführt. Die Bestimmungen ergaben

Glykokoll	% N berechnet	% N gefunden
	18,67	18,6
Glykokollkupfer	% Krystallwasser berechnet	% Krystallwasser gefunden
	7,85	7,69

Mit diesen Resultaten ist das Vorhandensein des Glykokolls sicher gestellt.

Wie schon oben erwähnt, gibt auch Gautier in seinem Lehrbuch an, dass das Conchiolin Glykokoll liefere. Seine Quelle für diese Angabe ist mir unbekannt geblieben.

Die Menge des gefundenen Glykokolls war erheblich und wird schätzungsweise etwa 4 g betragen haben.

1) B. d. d. ch. G. Bd. XVII.

Von weiteren Körpern ist in den letzten Fractionen in geringer Menge ein reducirender Körper vorhanden, welcher sich durch die Bildung von wenig rothem Kupferoxydul beim Eindampfen der Kupfersalzlösungen bemerklich macht. Ich habe nicht versucht, den Körper zu isoliren. Da weder Leucin noch Glykokoll gelöstes Kupferoxydhydrat beim Kochen reduciren, so muss es ein von ihnen verschiedener Körper sein.

Besondere Aufmerksamkeit habe ich noch dem Nachweise der von Schulze entdeckten Phenylamidopropionsäure¹⁾ gewidmet. Den Stoff selbst habe ich, wie aus dem Obigen ersichtlich ist, unter den Leucinfractionen nicht auffinden können. Ich habe daher untersucht, ob sich vielleicht bei der Oxydation einer Fraction des Rohleucins Benzoësäure bildet. Da Schulze angibt, dass die Phenylamidopropionsäure sich in der Regel in den späteren Fractionen findet, so habe ich eine von diesen, Fraction IV, deren Menge 1 g betrug, mit Kaliumbichromat und verdünnter Schwefelsäure gekocht. Beim Erkalten schied sich nichts aus. Die Reactionsflüssigkeit wurde nun mit Aether extrahirt. Als Verdunstungsrückstand hinterblieben wenige Tropfen, welche einen fettsäureartigen, üblen Geruch besaßen. Eine als Benzoësäure anzusprechende Substanz war in diesem Versuche also nicht aufzufinden. Um jedoch auch ganz geringe Mengen einer Phenylamidosäure nicht zu übersehen, wurden in einem besonderen Versuche 10 g Mytilus-Conchiolin von dem reinen Präparate mit Schwefelsäure zersetzt, der schwarze Bodensatz abfiltrirt und nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt auch das Tyrosin auskrystallisiren gelassen. Das gesammte übrig bleibende Amidosäurengemisch wurde mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat oxydirt. Die Reactionsflüssigkeit roch deutlich nach Benzoë, schied aber beim Erkalten keine Benzoësäure aus. Durch Ausschütteln mit Aether und Verdunstenlassen des Aethers liess sich ein Rückstand von wenigen glänzenden, gezackten Blättchen gewinnen, welche somit wahrscheinlich Benzoësäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 63.

waren. Es muss nach diesem Resultat angenommen werden, dass das untersuchte Rohconchiolin geringe Mengen einer Phenylamidosäure liefert. Jedoch sind diese Mengen wahrscheinlich so gering, dass man sie nur auf die dem Conchiolin in kleinen Mengen beigemengten andern Stoffe beziehen kann. — Parallel mit den Oxydationen der Leucinfractionen habe ich solche mit Mandelsäure ausgeführt und bin schon bei Verwendung weniger Decigramme zu Benzoëmengen gelangt, die zum Nachweis der Identität durch den Schmelzpunkt ausreichen.

Das Rohconchiolin, welches zum Studium der Zersetzungsprodukte verwendet worden ist, enthielt 0,65% Schwefel. Der Schwefel braucht nicht auf das Conchiolin selbst bezogen zu werden, sondern kann sehr wohl aus den Beimengungen herkommen, obwohl seine Menge nicht ganz gering ist.

Das reine Conchiolin aus Murexeischaalen soll nach Krukenberg keinen Schwefel enthalten. Ebenso wenig enthält ihn das von Voit untersuchte Conchiolin aus den Schaaalen der Perlmuschel. Dies letztere hat Engel noch einmal bestätigt. Die Häute der Perlmuschel lösen sich nach ihm beim Kochen in Kalilauge auf. Diese alkalische Lösung enthält keinen Schwefel. — Die Grundsubstanz der Murexeischaalen, welche nach Krukenberg reines Conchiolin sein soll, besteht nach Engel zum Theil aus einem schwefelhaltigen Keratin, zum Theil aus einem in Alkalilauge schwerer löslichen, schwefelfreien Stoff. Gautier fand im Conchiolin etwas Schwefel. (Siehe oben S. 389.)

Unter den mir vorliegenden Substanzen sehe ich das Conchiolin aus den rothen Pinna-schaalen als das reinste an. Das aus den Mytilus-schaalen enthält eine beträchtliche Menge des schwarzen Pigmentes, welches sich ohne Zerstörung der Schaaalen nicht extrahiren lässt. Der rothe Farbstoff dagegen, welchen die Pinna-schaalen enthalten, lässt sich grösstentheils mit Alkohol extrahiren. Vollständig lässt auch er sich nicht entfernen, da die Schaaalen stets einen röthlichen Ton behalten. Das zur Analyse verwendete Conchiolin war kalkfrei gewaschen,

sodann 24 Stunden mit einer 1%igen Natronlauge behandelt, der Pepsinsalzsäure- und der Pankreasverdauung unterworfen und nach dem Auswaschen mit Wasser, mit Alkohol und Aether von seinem Farbstoff befreit worden.

Es gab die Biuretreaction an der festen Substanz zwar nicht sehr intensiv, aber positiv, es färbte sich mit Millon's Reagens beim Erwärmen roth und gab die Xanthoproteïn-reaction. Mit concentrirter Salzsäure färbte es sich nicht violett, ebenso nicht mit Eisessig und concentrirter Schwefelsäure. Mit Kali geschmolzen, entwickelte es starken Skatolgeruch.

Da es die Biuretreaction gab, so sind wir nach den Arbeiten Kossel's berechtigt, einen Hexonkern in seinem Moleküle anzunehmen. Ich habe schon früher die relative Grösse dieses Kernes im Vergleich zu den Eiweisskörpern der Seide und zur Gelatine bestimmt. Entsprechende Bestimmungen wurden bald darauf von Hausmann¹⁾ für mehrere Eiweissstoffe publicirt. Hausmann bestimmte ausser dem in Form von basischen Stoffen vorhandenen Stickstoff noch den Stickstoff der Amidosäuren und den als Ammoniak abspaltbaren Stickstoff und gab damit ein vollständiges Bild für die Vertheilung des Stickstoffs im Moleküle der von ihm untersuchten Körper.

Hausmann's Verfahren für die Bestimmung des Stickstoffs im Phosphorwolframsäure-Niederschlag unterscheidet sich dadurch von meinem, dass er den Niederschlag in Alkali gelöst und mit abgemessenen Theilen dieser Lösung die Bestimmung nach Kjeldahl vorgenommen hat, während ich den Niederschlag nebst Filter im Kjeldahlkolben zerstört habe. Hausmann gibt auch Zahlen für die Gelatine an, für welche ich ebenfalls, um einen Vergleich mit den Bestimmungen Anderer zu ermöglichen, den Basenstickstoff bestimmt habe. Unsere Zahlen differiren sehr bedeutend. Ich habe 18,85% des Gesamtstickstoffs gegenüber 35,85% bei Hausmann angegeben. Diese Differenz erklärt sich indess auf sehr ein-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95.

fache Weise. Die Menge Stickstoff, die man erhält, wird bei verdünnten Lösungen zu niedrig, bei sehr concentrirten zu hoch ausfallen, da man in dem einen Falle nicht alle Basen ausfällt, im andern ausser den Basen wahrscheinlich auch noch Amidosäuren mit ausfallen können. Diese lassen sich freilich, wenn auch schwierig, aus dem Niederschlage durch Auswaschen entfernen. Absolut genommen sind daher meine Zahlen, wie schon aus einer Bemerkung in meiner früheren Arbeit hervorgeht¹⁾, zu niedrig, während Hausmann's um die obere Grenze sich bewegen und annähernd den absoluten Werthen entsprechen mögen. Wenn ich unter diesen Voraussetzungen die von mir angegebene Zahl von 8,66% Basenstickstoff für das Pinnaconchiolin in Vergleich mit den von Hausmann für Casein, Serumglobulin etc. angegebenen Zahlen setzen will, so muss ich für eine Abschätzung die Zahlen beider für die Gelatine heranziehen. Danach ergibt sich, dass das Conchiolin wahrscheinlich etwas mehr Diaminostickstoff enthält als das Casein und weniger als das Eieralbumin.

Zu dieser Bestimmung ist nicht das mit Alkali und durch Verdauung gereinigte, sondern das nach der Entkalkung und dem Auswaschen nur mit Alkohol und Aether behandelte rothe Pinnaconchiolin verwendet worden.

Ich habe schon vor meiner früheren Publication eine Bestimmung des als Ammoniak abspaltbaren Stickstoffs gemacht, welche ich damals nicht mit angegeben habe, da ich sie noch auf andere Substanzen ausdehnen wollte. Meine Bestimmungen lassen auf diesem Gebiete einen direkten Vergleich mit denen Hausmann's zu, wie aus den für die Gelatine gefundenen Werthen hervorgeht. Nach Hausmann enthält Gelatine 1,61% Amidstickstoff, nach meinen Bestimmungen 1,76%, Werthe, welche kaum ausserhalb der möglichen Analysenfehler liegen.

Da ich voraussichtlich keine Gelegenheit haben werde, meine Erfahrungen auf diesem Gebiete zu erweitern, so stelle

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 539.

ich hier neben die für das Conchiolin gefundenen Werthe auch die für das Fibroin und den Seidenleim gefundenen, da ich diese Zahlen für sich nicht publiciren kann. In dieselbe Tabelle bringe ich einige von Hausmann (H.) untersuchte Körper.

	Amidstickstoff	Diaminostickstoff
Fibroin aus weisser Seide	0,42	—
Fibroin aus gelber Seide	0,56	—
Leim (Gelatine)	1,76 (1,61 H.)	18,85 (35,83 H.)
Roths Pinnaconchiolin	3,47	8,66
Seidenleim aus gelber Seide	8,24	10,00
Eieralbumin	8,53 (H.)	21,33 (H.)
Casein	13,37 (H.)	11,71 (H.)

Der Seidenleim enthält hiernach etwa ebenso viel Amidstickstoff, als das Eieralbumin, das Fibroin enthält sehr viel weniger, jedoch mehr als die Gelatine, das Conchiolin steht in der Mitte zwischen dem Fibroin und dem Eieralbumin.¹⁾

Die Analysen der Substanz ergaben folgende Werthe. Diese beziehen sich auf den bei 125—130° getrockneten und aschefrei berechneten Stoff.

0,1568 g Substanz gaben 0,0922 g H₂O und 0,3039 g CO₂, entsprechend 52,87% C und 6,54% H.

0,1541 g Substanz entsprachen bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 8,01 ccm. einer Viertelnormallauge, entsprechend 16,69% N. 1 ccm. der Lauge entspricht 3,2115 mg N.

0,1770 g Substanz entsprechen 8,95 ccm. derselben Lauge, entsprechend 16,51% N.

0,6355 g Substanz gaben 0,0392 g BaSO₄, entsprechend 0,85% S.

Die Schwefelbestimmung wurde nach v. Asbóth²⁾ ausgeführt.

	% C	% H	% N	% S
Conchiolin				
aus rothen Pinnaschaalen	52,87	6,54	16,6	0,85
Eischaalen von Murex				
nach Engel ³⁾	52,9	7,55	16,09	0,472
(Mittel aus seinen Analysen)				

¹⁾ Beziehungen zu anderen Eiweisskörpern lassen sich mit Hülfe der inzwischen publicierten Tabellen von Kossel und Kutscher feststellen. Sitzungsbr. d. Gesellschaft z. Bfrdg. d. ges. Naturw. z. Marburg, vom 6. April 1900.

²⁾ Chemikerzeitung 1895.

³⁾ Zeitschrift f. Biologie, Bd. 27, S. 383 u. 384.

Die Analyse ergibt einen höheren Kohlenstoffgehalt als diejenigen Schlossberger's¹⁾ und Krukenberg's.²⁾ Am besten stimmt sie noch zu der darunter gesetzten von Engel, welche sich auf die Grundsubstanz der Eischalen von Murex bezieht. Auffallend ist in meiner Analyse das Vorhandensein von Schwefel, welches dem Conchiolin fehlen soll.

Die von Engel untersuchten Häute aus Perlmuscheln, welche keinen Schwefel mehr enthielten,³⁾ waren zuerst mit verdünnter Salzsäure und Pepsin, dann während einer halben Stunde mit einer 1/2procentigen heissen Lauge, dann mit heisser Essigsäure und mit Wasser behandelt worden. Ich glaube, dass die von mir vorgenommene Behandlung der Eischalen ebenfalls hätte genügen müssen, um Eiweisssubstanzen zu entfernen. Da trotzdem der Rest noch schwefelhaltig war, so bleibt wohl nichts übrig als die Annahme, dass der Grundstoff dieser Schalen in der That ein schwefelhaltiges Albuminoid ist oder wenigstens, ähnlich wie die Schalen von Murex nach Engel, neben einem schwefelfreien noch einen schwefelhaltigen enthält.

Ich habe das so gereinigte Conchiolin noch einmal mit einer Zehntelnormalnatronlauge eine Woche lang extrahirt. Auch der jetzt erhaltene ungelöste Stoff gab bei der Schön'n'schen Probe noch Violettfärbung mit Nitroprussidnatrium und Braunfärbung beim Zusatz alkalischer Bleilösung. Er enthielt also ebenfalls noch Schwefel. Eine Bestimmung der Menge dieses Schwefels ist nicht gemacht worden. — Dass die gefundenen 0,85% S nicht auf dem geringen Aschegehalt von 0,8% beruhen können, geht schon daraus hervor, dass selbst durch die Annahme, dass die ganze Asche aus schwefelsaurem Salz bestünde, nur ein kleiner Bruchtheil des Schwefels seine Erklärung fände.

Indessen lassen sich die widersprechenden Angaben durch die Annahme erklären, dass der Schwefel des Conchiolins nicht als Bleischwefel gewonnen werden kann, sondern in

1) Chemie der Gewebe. S. 234.

2) B. d. d. ch. G. Bd. XVIII.

3) Zeitschrift f. Biologie, Bd. 28, S. 351.

einer andern Form gebunden ist. Ueber die verschiedenen Bindungsweisen des Schwefels im Eiweiss sind wir besonders durch die Arbeiten von Krüger und von Schulz aufgeklärt worden. Auf Grund dieser Arbeiten erklärt es sich, dass Engel den im Conchiolin der Perlmuschel schwer abspaltbaren Schwefel übersehen haben kann, da er den Nachweis dadurch versucht hat, dass er das in Alkali gelöste Conchiolin mit einer alkalischen Bleilösung versetzte. Dabei trat keine Schwärzung auf. In der That gibt das von mir zur Elementaranalyse verwendete Pinnaconchiolin keine Schwärzung beim Kochen mit einer alkalischen Bleilösung.

Wenn ich auch für die Richtigkeit dieser Beobachtungen einstehe, so kann ich mich doch schwer entschliessen, definitiv die Zugehörigkeit des Schwefels zum Molekül des Conchiolins anzunehmen, da ich immer noch besorge, dass ich irgend einen Punkt nicht berücksichtigt haben könnte, aus dem die Anwesenheit des Schwefels sich durch einen nicht zum Conchiolin gehörigen Stoff erklären würde.

Anhangsweise möchte ich noch einige Angaben über die ausser dem Conchiolin in den SchaaLEN enthaltenen Substanzen machen.

Bei der Entkalkung mit Salzsäure tritt ein ziemlich starkes Schäumen der Entkalkungsflüssigkeit auf, welches vermuthlich auf der Anwesenheit gelöster organischer Produkte beruht. Diesem Körper bin ich nicht weiter nachgegangen.

Die entkalkte Grundsubstanz enthält bei *Mytilus* einen schwarzen, bei *Pinna* einen rothen Farbstoff. Beide sind völlig verschieden von einander.

1. Der Farbstoff aus den rothen Pinnaschaalen.

Aus den zerkleinerten, nicht entkalkten SchaaLEN lässt sich mit Alkohol kein Farbstoff extrahiren. Auch wenn der Alkohol mit Salzsäure versetzt ist, ändert dies nichts.

Aus den mit Säure entkalkten SchaaLEN dagegen lässt sich der gelbrothe Farbstoff mit Alkohol sowohl wie mit Aether

extrahiren. Die Extraction gelang nie vollständig, auch nach stundenlanger Extraction im Soxleth'schen Extractionsapparat blieben die Schaaalen noch röthlich gefärbt. Ausser in Aether und Alkohol erwies sich der Stoff noch als in Chloroform und in Olivenöl löslich. In Wasser ist er unlöslich. Giesst man die alkoholische Lösung in viel Wasser, so scheidet er sich in Flocken aus und lässt sich abfiltriren.

Die alkoholische Lösung gibt eine diffuse Absorption im blauen Theile des Spectrums, jedoch treten keine Absorptionsbänder auf.

Seiner Löslichkeitsverhältnisse wegen wird der Farbstoff den Lipochromen anzureihen sein.

2. Der schwarze Farbstoff der Mytilusschaalen.

Beim Kochen der Schaaalen mit Säuren bleibt eine schwarze Masse ungelöst. Ein Theil des schwarzen Körpers geht in die Lösung über. Dieses liess sich aus einer Probe der Flüssigkeit durch Zusatz von Kupfersulfat ausfällen und setzte sich in Flocken ab. Die darüber stehende Flüssigkeit bleibt dann noch schwach gelb gefärbt. Der in Lösung gegangene Farbstoff ist nicht gewonnen worden, meine Angaben beziehen sich nur auf das ungelöste schwarze Pigment.

Ich muss es unentschieden lassen, ob dieser schwarze Stoff im Wesentlichen dem ursprünglichen Farbstoff entspricht oder als neugebildete Melaninsäure anzusehen ist. Da letztere nach Schmiedeberg stets nur in geringer Menge gebildet wird, so ist es nicht ausgeschlossen, dass wir es im Wesentlichen mit dem ursprünglichen Farbstoff zu thun haben. Ich habe mich darauf beschränkt, ein reineres Produkt aus dem Bodensatze zu gewinnen und dessen Eigenschaften festzustellen.

Mikroskopisch zeigten die gröberen Theile des Bodensatzes eine faserige Structur, es waren also noch unzersetzt gebliebene Antheile des äusseren Blattes der Mytilusschaalen. Diese werden also durch 24stündiges Kochen mit Schwefelsäure nicht völlig in Lösung gebracht. Der abfiltrirte und schwefel-

säurefrei gewaschene Niederschlag gab folgende analytische Resultate:

57,5°C, 5,7% H, 10,6% N.

Der hohe Kohlenstoffgehalt deutet den Charakter eines Melanins an.

Indes besteht die Substanz noch aus zwei verschiedenen Stoffen. Dies geht daraus hervor, dass die Theilchen derselben nach mehrmaliger Extraction mit Natronlauge quellen und dann eine hellbraun durchscheinende Masse darstellen, also nicht wie das Melanin rein schwarz sind. Ferner zeigt die Analyse der durch Auflösen in Natronlauge und Wiederausfällen mit Säuren gereinigten Substanz eine erheblich andere Zusammensetzung.

Die reine Substanz habe ich auf folgendem Wege gewonnen. Das abfiltrirte und ausgewaschene rohe Melanin wurde mit einer Viertelnormallauge übergossen und verrieben, darauf centrifugirt. Ein bedeutender Theil war in Lösung gegangen. Von dem Bodensatz wurde vorsichtig abgegossen und die tiefschwarze Flüssigkeit noch mehrmals filtrirt. Eine Probe der Flüssigkeit gab, mit viel Wasser bis zur Durchsichtigkeit verdünnt, eine weinrothe völlig klare Lösung, aus der sich auch bei längerem Stehen nichts absetzte.

Aus dieser Lösung lässt sich der Stoff mit Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure und Essigsäure fällen. Es ist daher eine schwache Säure und er darf daher kurz als Melaninsäure bezeichnet werden. Aus der genau neutralisirten Flüssigkeit wird die Melaninsäure mit Lösungen von Kupfersulfat, Silbernitrat und Quecksilberchlorid in Form der betreffenden Metallsalze ausgefällt. Von diesen habe ich das Kupfersalz in Mengen von einigen Decigrammen gewonnen. Es löste sich in verdünnter Natronlauge und wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Abfiltrieren des Schwefelkupfers erwies sich der Aschenrückstand des eingedampften und veraschten Filtrates als kupferfrei. Dies Verfahren dürfte daher zur Umfällung und Reinigung der Melaninsäure anwendbar sein.

Die durch Auflösen in Natronlauge, Abcentrifugiren des unlöslichen Theils und Ausfällen mit Schwefelsäure gewonnene

Melaninsäure zeigte in verschiedenen Präparaten, welche durch gesonderte mehrmalige Extraction des schwarzen Gesamtrückstandes mit Natronlauge gewonnen wurden, eine ziemlich constante Acidität. Diese wurde bestimmt durch Auflösen in einem Ueberschuss einer Zehntelnormalnatronlauge und Zurücktitriren mit einer Zehntelnormalschwefelsäure. Die Zahlen für die Acidität bezeichnen die Anzahl Cubikcentimeter der Lauge, welche zur Neutralisation von 100 g der lufttrockenen Substanz erforderlich sein würden. Die Bestimmungen sind jedesmal mit einigen Decigrammen ausgeführt worden. Als Endreaction wurde der Zeitpunkt benutzt, wo ein Tropfen der Lösung, auf Curcumapapier gebracht, dieses nicht mehr bräunte. Wegen der dunklen Farbe der Flüssigkeit erforderte die Beobachtung dieses Momentes grosse Aufmerksamkeit.

Die Bestimmungen ergaben:

Präparat	I) 100 g Melaninsäure	= 2560 ccm.
„	II ₁) 100 „	= 2469 „
„	II ₂) 100 „	= 2366 „
„	II ₃) 100 „	= 2429 „

Die Analyse der bei 110° getrockneten Substanz ergab:

62,05% C, 3,9% H, 7,7% N.

Diese Werthe weichen von denen des unreinen Präparates erheblich ab und beweisen damit wiederum, dass in der ungelöst gebliebenen schwarzen Masse sich ausser der Melaninsäure noch ein anderer Stoff befindet.

Die Melaninsäure löste sich mit Leichtigkeit in einer Zehntelnormalnatronlauge, ebenso in Ammoniak und in Lösungen von kohlen-saurem Natron. Die leichte und vollständige Löslichkeit in Natronlauge spricht neben der Uebereinstimmung der Aciditätswerthe für das Fehlen fremder Beimengungen.

Die analysirten Produkte enthielten noch Asche, welche nicht bestimmt worden ist.

Eisen enthält die Substanz nicht. Ich habe mehrere Decigramm, den Angaben von Röhmann und Steinitz¹⁾ entsprechend, mit Ammoniumnitrat und concentrirter Schwefel-

1) Zeitschrift f. analytische Chemie, Jahrg. XXXVIII, S. 433.

säure nach Neumann¹⁾ verbrannt, die Reaktionsmasse in Wasser gelöst, mit Ammoniak übersättigt und mit Salmiaklösung und Schwefelammonium versetzt. Es entstand keine Spur eines Niederschlages oder einer Schwärzung.

Ich weiss sehr wohl, dass die hier gegebenen Facta noch nicht zur Charakterisirung der Melaninsäure ausreichen und der Ergänzung bedürfen. Da ich aber wenig Aussicht darauf habe, diese Untersuchungen noch einmal wieder aufnehmen zu können, so gebe ich die angeführten Thatsachen in dem Wunsche, dass ein physiologischer Chemiker, der sich später einmal an die Untersuchung dieses Stoffes machen sollte, schon einiges zur Orientirung vorfinden möge.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Das Conchiolin liefert als Zersetzungsprodukte mit Schwefelsäure Tyrosin, Leucin (Amidocaprinsäure) und Glykokoll. Das Auftreten von Phenylamidopropionsäure oder einer andern Phenylamidosäure ist nicht wahrscheinlich. S. 396—401.

2. Es enthält einen Hexonkern (Biuretreaction und mit Phosphorwolframsäure fällbare Spaltungsprodukte). Die Menge der basischen Produkte weist ihm seine Stellung zwischen Casein und Eieralbumin an. S. 402—404.

Die Menge des in Form von Ammoniak abspaltbaren Stickstoffs beträgt 3,47% des Gesamtstickstoffs. S. 404.

3. Es enthält einen aromatischen Kern im Molekül (Rothfärbung mit Millon'schem Reagens, Fäkalgeruch der Kalischnmelze, Anwesenheit von Tyrosin unter den Spaltungsprodukten.) S. 401/402 und 396/397.

4. Der organische Rest der Perlmuttersubstanz der Muschelschaalen unterscheidet sich von den übrigen organischen Schaalenresten durch einen geringeren Kohlenstoffgehalt. S. 392 und 393.

¹⁾ Archiv f. Anatomie u. Physiologie, Physiolog. Abtheilg., 1897, S. 552.

Ueber Acetophenonazobilirubin.

Von
Dr. Fr. Pröcher.

Mit einer Tafel.

(Aus dem Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. Main.)

(Der Redaction zugegangen am 15. April 1900.)

Als Ehrlich im Jahre 1883¹⁾ seine Untersuchungen über die Diazoreaction des Harns publicirte, zeigte er, dass das Bilirubin sich mit Diazobenzolsulfochlorid zu einem prachtvollen Farbstoff combinirt. Diese leicht ausführbare und, wie weiter unten gezeigt werden wird, für den Nachweis des Bilirubins äusserst scharfe Reaction ist bis jetzt für klinische Zwecke sehr wenig angewandt worden. Da es von grossem Interesse war, dieses neue Derivat des Bilirubins in chemisch reiner Form in Händen zu haben, habe ich versucht, den aus Bilirubin und einer Diazoverbindung sich bildenden Farbstoff zu isoliren. Das Bilirubin wurde aus Rindergallensteinen nach der Methode von Staedler und Maly dargestellt und nach Küster²⁾ aus Dimethylanilin umkrystallisirt. Zunächst möchte ich bemerken, dass das Bilirubin³⁾ sich am leichtesten mit Diazoverbindungen combinirt. Sehr bemerkenswerth ist, und steht das Bilirubin meines Wissens in dieser Beziehung allein da, dass es in so stark saurer, ja selbst in concentrirter Salzsäure sich mit Diazoverbindungen kuppelt. Die grösste Mehrzahl aromatischer Amine, Phenole etc. kuppeln sich mit Diazo-

1) Charité Annalen, Bd. VIII.

Centralblatt für klinische Medicin, 1883, Nr. 45.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 315.

3) Von den übrigen Gallenfarbstoffen geben nur Biliprasin und Bilifuscin die Reaction, aber in bedeutend schwächerem Maasse. Bilinunin und Biliverdin combiniren sich mit Diazoverbindungen nicht.

verbindungen in stark saurer Lösung gar nicht. Ehe ich zur Beschreibung der Darstellung des Azobilirubins übergehe, möchte ich noch Einiges über die Schärfe der Reaction mittheilen.

Zur Ausführung der Reaction gibt man der auf Bilirubin zu prüfenden Flüssigkeit $\frac{1}{3}$ Volumen Alkohol zu und säuert die Flüssigkeit mit concentrirter Salzsäure stark an und gibt dann die bekannte Ehrlich'sche Diazolösung zu. Ist Bilirubin in nicht zu geringer Menge vorhanden, so färbt sich die Flüssigkeit blau, ist Bilirubin nur in Spuren da, so wird die Flüssigkeit dunkler. Schüttelt man jetzt mit Chloroform aus, so geht das Azobilirubin je nach der Concentration der Lösung mit blauer oder blauvioletter Farbe in das Chloroform über. Das Bilirubin ist mit Hülfe dieser Reaction noch in einer Verdünnung von 1:60 000 nachweisbar. Eine genaue Beschreibung der Reaction für klinische Zwecke werde ich demnächst in einer klinischen Zeitschrift publiciren.

Zur Darstellung des Azobilirubins wird das Bilirubin in Chloroform gelöst, die Lösung soweit mit Alkohol verdünnt, dass das Bilirubin in Lösung bleibt, und stark mit Salzsäure angesäuert. Als Paarling wurde Amidoacetophenon benutzt,¹⁾ das in Alkohol gelöst, mit Salzsäure angesäuert und mit der berechneten Menge Natriumnitrit, das vorher in wenig Wasser gelöst wird, in Diazoacetophenon übergeführt. Die Diazoacetophenonlösung wird der Bilirubinlösung allmählich zugegeben. Den Endpunkt der Reaction erkennt man am besten daran, dass ein Tropfen der Lösung, auf Tüfelpapier getropft, mit Diazoacetophenonlösung keine stärkere Blaufärbung mehr gibt. Ist die Reaction beendet, so gibt man die Lösung in stark mit Salzsäure angesäuertem Wasser. Es scheidet sich das Chloroform aus, das den gesammten Azokörper mit blauer Farbe aufnimmt. Zugleich geht das überschüssige Diazoacetophenon und der Alkohol in das Wasser über. Man trennt das Wasser möglichst vom Chloroform und wäscht mit destillirtem Wasser so lange aus, bis dasselbe durch Silbernitrat nicht mehr getrübt wird. Beim Auswaschen der sauren Chloroformlösung

¹⁾ Statt Amidoacetophenon kann auch jede andere diazotirbare Amidoverbindung verwendet werden.

schlägt die blaue Farbe des Azobilirubins in Roth um. Nach dem Auswaschen wird die Chloroformlösung des Azobilirubins durch ein trockenes Faltenfilter filtrirt und das überschüssige Chloroform aus dem Wasserbade abdestillirt. Die concentrirte Lösung wird in flachen SchaaLEN, die zweckmässig unter den Exsiccator gebracht werden, der mit Paraffinschnitzeln beschickt ist, der Krystallisation überlassen. Die Krystalle sind mikroskopisch klein und bestehen aus prismenförmigen Nadelchen, die im auffallenden Lichte fuchsinartigen Glanz haben, im durchfallenden schwarz erscheinen. Das Acetophenonazobilirubin ist nach ein- bis zweimaligem Umkrystallisiren aus Chloroform nahezu analysenrein. Die empirische Zusammensetzung des Acetophenonazobilirubins ist $C_{24}H_{25}N_4O_4$, besteht also aus einem Molekül Bilirubin und einem Molekül Diazoacetophenon, was durch die Analyse bestätigt wird.

$C_{24}H_{25}N_4O_4$ Ber.: C 66,51, H 5,98, N 12,93

Gef.: C 66,17, H 5,77, N 12,44.

0,1954 g Substanz: 0,4741 g CO_2 und 0,1054 g H_2O

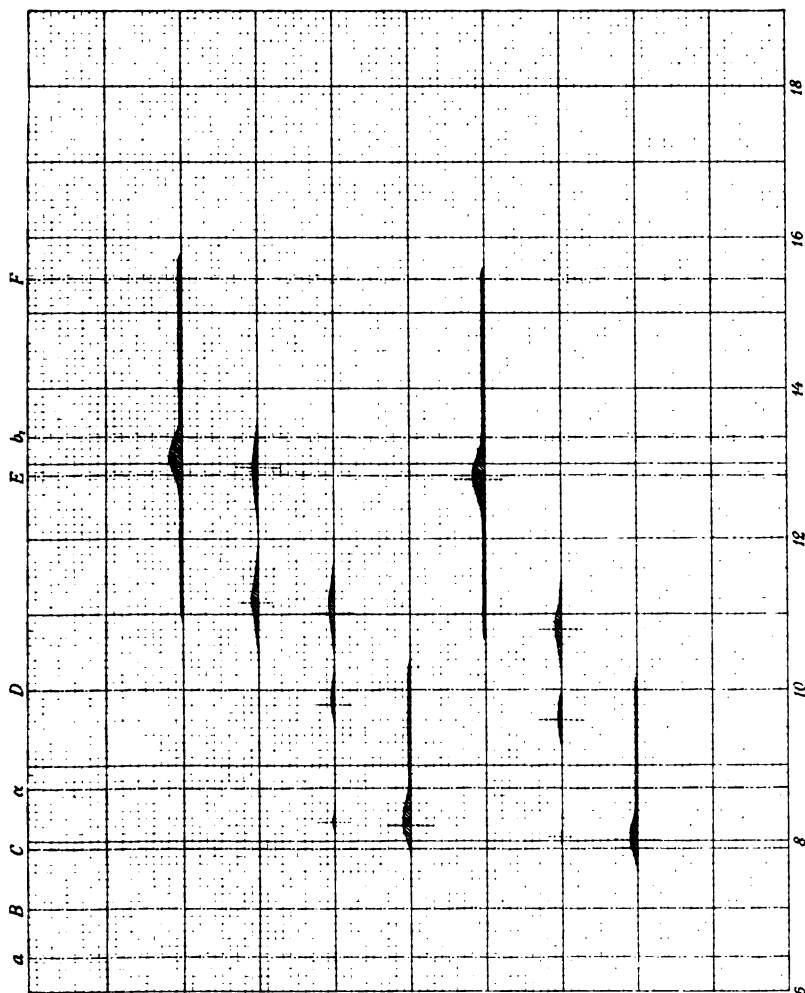
0,1536 „ „ 17,39 ccn. N (15,7°, 746,0 mm).

Das Acetophenonazobilirubin stellt die Monoazoverbindung des Bilirubins dar; ob Di- oder Triazoverbindungen möglich sind, konnte ich bis jetzt nicht feststellen, und wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein. Das Acetophenonazobilirubin ist in Chloroform, Alkohol, Amylalkohol, Dimethylanilin, Dichlorhydrin, concentrirter Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, verdünnter Kalilauge und Ammoniak leicht löslich; in Aether, Schwefelkohlenstoff, Wasser sehr schwer, in concentrirter Kalilauge völlig unlöslich. Die neutrale Lösung ist roth, die alkalische (grün), die ammoniakalische violettroth, die salzsaure und schwefelsaure Lösung blau. In concentrirtem Ammoniak löst sich das Azobilirubin mit blauer Farbe, die beim Verdünnen mit Wasser oder Alkohol in Rothviolett übergeht. Löst man Azobilirubin in Essigsäure, so erhält man eine rothe Lösung, die bei Zusatz von Salzsäure in Blau umschlägt. Das Azobilirubin verhält sich in dieser Beziehung wie das Safranin, das in essigsaurer Lösung roth, in salzsaurer Lösung blau ist. Die rothe Lösung stellt wahrscheinlich die monoacide, die blaue die diacide Lösung des Farbstoffes dar.

Es war ferner von Interesse, das spectroscopische Verhalten des Azobilirubins kennen zu lernen. Herr J. Formànek in Prag hatte die Güte, die spectralanalytische Untersuchung auszuführen, wofür ich ihm an dieser Stelle bestens danke. Er theilte mir Folgendes mit: Acetophenonazobilirubin ist in Wasser fast unlöslich, in Aethyl- und Amylalkohol leicht mit rother Farbe löslich. Die passend verdünnte Farbstofflösung liefert unter Anwendung der Reagentien charakteristische Farbenveränderungen, und demgemäss verschiedene Absorptionsspectra, welche jedoch verwaschen erscheinen. In nachstehender Tabelle sind die Aenderungen, welche die Farbstofflösung nach Zusatz der Reagentien erleidet, zusammengestellt, sowie die Dunkelheitsmaxima der Absorptionsstreifen in Wellenlängen angegeben. Die Wellenlänge der Dunkelheitsmaxima der Absorptionsstreifen konnte nur annähernd bestimmt werden, nachdem die Streifen theilweise verwaschen sind. Die spectroscopisch-chemischen Reactionen sind jedoch so charakteristisch, dass man diesen Farbstoff auf diesem Wege leicht nachweisen kann. Als Reagentien wurden verwendet: verdünnte Salzsäure 1 : 3, Ammoniak vom specifischen Gewicht 0,96 1 : 5, Kalihydrat in Aethylalkohol 1 : 10, und zwar von jedem Reagens etwa 3 Tropfen auf 5 ccm. verdünnter Farbstofflösung.

In Aethylalkohol				In Amylalkohol			
Absorption	Salzsäure	Ammoniak	Kalihydrat in Aethylalkohol	Absorption	Salzsäure	Ammoniak	Kalihydrat in Aethylalkohol
verwaschener Streif 524,9	wenig Säure: blauviolett, verwaschene Streifen 561,4—525,8 mehr Säure: blau, verwaschene Streifen 594,8—564,7 concentrirtere Lösung: 642,1 (kaum sichtbar)	ändert sich nicht	bläulich-grün verwaschener Streif 643,1	verwaschener Streif 528,5	blau, verwaschene Streifen 600,2—566,5 concentrirtere Lösung 649,0 (kaum sichtbar)	ändert sich nicht	grün verwaschener Streif 6,50,0

Absorptionsspectrum des Acetophenonazobilirubin.



Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band XXIX.
 1898, Über Acetophenonazobilirubin.

Verlag von A. W. Scherl, Leipzig
 24. Neue A. W. Scherl, Leipzig, 24.

Das Azobilirubin gehört nach Formánek¹⁾ in die Gruppe VII der rothen Farbstoffe seiner Anleitung.

Die Lösungen des Azobilirubins sind äusserst stabil und verändern ihre Farbe bei tagelangem Stehen fast gar nicht. Das Azobilirubin unterscheidet sich vom Bilirubin durch seine ausserordentlich hohe Beständigkeit. Während z. B. die alkalische Lösung des Bilirubins beim Stehen an der Luft in Biliverdin umgewandelt wird, wird die Azoverbindung nicht verändert. Durch concentrirte Schwefelsäure wird Azobilirubin nicht verändert, während Bilirubin in kurzer Zeit zerstört wird. Weiterhin ist das Azobilirubin gegen salpetrige Säure relativ beständiger als das Bilirubin. So wird eine Lösung des Azobilirubins in concentrirter Schwefelsäure durch Natriumnitrit gar nicht verändert, während das Bilirubin zu Biliverdin und weiter zu einem blauen Farbstoff oxydirt wird. Es scheint demnach die Azogruppe an der Stelle des Bilirubins einzugreifen, an der es eine besonders labile Wasserstoffgruppe besitzt, die zu gleicher Zeit die Veranlassung zur leichten Zerstörbarkeit des Bilirubins bietet. Der Umstand, dass die Paarung in so stark saurer Lösung vor sich geht, kann mit Rücksicht darauf, dass die aromatischen Basen in saurer, die Phenole in alkalischer Lösung sich mit Diazoverbindungen kuppeln, darauf hindeuten, dass auch in diesem Falle das Bilirubin einen aromatischen Complex enthält, der eine frei oder passend substituirte Amidogruppe enthält. Durch Reduction des Azobilirubins mit Schwefelammonium gelangt man zu einem neuen Körper. Ob das Reduktionsprodukt die Hydrazo- oder Amidoverbindung des Bilirubins darstellt, darüber werde ich demnächst berichten.

¹⁾ Formánek, Spectralanalytischer Nachweis künstlicher, organischer Farbstoffe. Verl. von J. Springer, Berlin 1900.

Ueber die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff.

Von

Docent Dr. **Em. Formánek.**

(Aus dem Institute für angew. medicinische Chemie der böhm. Universität in Prag.)

(Der Redaction zugegangen am 28. April 1900.)

Bei den Untersuchungen über die Vorstufen der Harnsäure benützte im Jahre 1891 Professor Horbaczewski zur Sterilisirung einer faulenden Flüssigkeit, welche auf ungefähr 40—50° C. erwärmt war, Chloroform. Bei dieser Gelegenheit beobachtete er, dass der Blutfarbstoff von Chloroform gefällt wurde.

Diesen Umstand weiter zu verfolgen, ist der Zweck der vorliegenden Arbeit.

In dieser Richtung sind folgende Versuche angestellt worden :

Zweimal umkrystallisirtes Oxyhämoglobin wurde in Wasser gelöst, auf 50—55° C. erwärmt und mit Chloroform geschüttelt. Es bildete sich ein feinflockiger Niederschlag, der eine sehr schwache Tendenz zum Absetzen zeigte. Nach der Filtration wurde eine klare Flüssigkeit erhalten, in welcher der Blutfarbstoff spectroscopisch nicht nachweisbar war. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass auch ein ziemlich reines Hämoglobin mit Chloroform vollkommen gefällt wird. Es handelte sich nun darum, sich eine grössere Menge dieser Verbindung in reinem Zustande darzustellen, um analytisch ihre Zusammensetzung feststellen zu können.

Zu diesem Zwecke wurden vier Liter defibrinirten Pferdeblutes mit 36 Liter 3%iger Kochsalzlösung sedimentirt, von

den abgesetzten Blutkörperchen wurde die darüber stehende Flüssigkeit mittelst eines Hebers abgezogen und aus denselben mit Hülfe eines gleichen Volumens Aethers eine lackfarbene Lösung des Blutfarbstoffes bereitet.

Die klar filtrirte Flüssigkeit wurde zur Darstellung der Chloroformverbindung benützt. Es muss hervorgehoben werden, dass alle geschilderten Operationen nahe bei 0° und in freier Luft durchgeführt wurden.

Die oben erwähnte klare Lösung wurde in eine 10 Liter fassende Flasche gegeben, auf 50—55° C. erwärmt, mit 200 g Chloroform versetzt, mit gut eingeschliffenem Glasstöpsel verschlossen und geschüttelt. Das Schütteln geschah in grösseren Intervallen, wobei die sich bildenden Chloroformdämpfe durch vorsichtiges öfteres Oeffnen des Stöpsels ausgelassen wurden. Nach einigen Minuten des Schüttelns wurde die Flasche wieder in ein auf 55° C. erwärmtes Wasser gestellt.

Die Flüssigkeit trübte sich und es bildete sich langsam ein flockiger Niederschlag, der sich nach einigen Stunden zu Boden setzte. Am nächsten Tage wurde die farblose, über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit, welche bei der spectroscopischen Untersuchung keine Absorptionsstreifen zeigte, mittelst eines Hebers abgezogen und der Niederschlag viermal mit je 9 Liter einer 2^o/oigen Kochsalzlösung gewaschen. Um das Kochsalz zu entfernen, wurde der Niederschlag viermal mit destillirtem Wasser decantirt, hierauf in 96^o/oigen, dann in absoluten Alkohol und schliesslich in Aether gebracht. Vom Aether wurde abfiltrirt und der Niederschlag an freier Luft getrocknet.

Derselbe stellte eine ziegelrothe Masse dar, welche nach völligem Austrocknen in ein sehr feines Pulver zerfiel.

Die Masse wurde nun bei 130° C. im Trockenkasten zum constanten Gewichte getrocknet und ein Theil derselben mit Soda und Salpeter verbrannt. In der wässerigen, mit Salpetersäure angesäuerten Lösung der Schmelze konnte mittelst salpetersauren Silbers Chlor nicht nachgewiesen werden. Der Niederschlag besteht demnach nicht aus einer Chloroformverbindung des Blutfarbstoffes, sondern es wurde das Chloro-

form bereits durch Einwirkung von Alkohol und Aether u. s. w. dem Niederschlage entzogen.

Nun lag die Vermuthung nahe, dass dieser Niederschlag ein mit Alkohol gefällter Blutfarbstoff sei. Behufs Entscheidung dieser Vermuthung wurde in der Substanz der Stickstoff nach Kjeldahl und das Eisen elektrolytisch bestimmt.

2,215 g der bei 130° C. getrockneten Substanz gaben 0,3584 g Stickstoff entsprechend 16,2%.

1,7426 g derselben Substanz wurden in einem Platintiegel verascht, mit saurem schwefelsauren Kali geschmolzen, in Wasser gelöst, mit Ammoniak vorsichtig neutralisirt, mit 3 g oxalsauren Ammons versetzt und bei 1 Ampère und 2,5 Volt das Eisen elektrolytisch bestimmt. Es ergaben sich 0,0068 g Eisen, entsprechend 0,33%.

Da das Pferdehäoglobin 17,31—17,94% Stickstoff enthält, war es klar, dass dieses Präparat entweder kein Oxyhäoglobin ist, oder dass es eine Mischung von Blutfarbstoff und anderen Eiweissstoffen des Blutes sei, wobei man annehmen müsste, dass das Chloroform auch andere Eiweissstoffe mitgefällt hat.

Um sich über die Zusammensetzung des Niederschlages näher zu orientiren, wurde ein neues Präparat durch Fällung des Oxyhäoglobins mit Chloroform bereitet, mehrmals auf der Centrifuge mit Wasser gewaschen, die obere Schichte des Niederschlages möglichst chloroformfrei abgegossen, durch Zusatz von 1—2 Tropfen Soda gelöst und spectroscopisch untersucht. Die Lösung zeigte zwei schwache Absorptionsstreifen des Oxyhäoglobins. Wurde nun die Lösung mit Schwefelammonium versetzt, so verschwanden die zwei Streifen und es entstand der eine Absorptionsstreifen des Häoglobins. Dieser Streifen war in der Mitte ein wenig dunkler und im Roth war zugleich ein schwacher Absorptionsstreifen zu sehen; der letztere gehörte dem Thiohäoglobin, die Verstärkung des Häoglobinstreifens rührte davon her, dass sich auch ein wenig Hämatin bildete, welches durch Einwirkung von Schwefelammonium Häochromogen gab, dessen Absorptionsstreifen die Mitte des Häoglobinstreifens verstärkte.

Benützt man als Reductionsmittel das basische weinsaure Eisenoxydul, bleibt die Linie im Roth aus, der Hämoglobinstreifen besitzt aber eine starke Schattirung in der Mitte, was jedenfalls durch Hämochromogen, welches aus dem Hämatin entsteht, bewirkt wird.

Aus diesem Verhalten sieht man, dass aus dem Chloroformniederschlage des Oxyhämoglobins dieses letztere wieder erhalten werden kann.

Bei der Behandlung des Niederschlages mit Alkohol wird das Chloroform aus dem Niederschlage entfernt und der letztere in ein schwerer lösliches Oxyhämoglobin verwandelt.

Das Verhalten des Chloroforms zu den Eiweissstoffen wurde an einer Lösung von Eiereiweiss und am Blutserum geprüft.

Das Blutserum wird bei saurer Reaction bei einer Temperatur von 50—55° C. ziemlich rasch gefällt, ebenso bei neutraler Reaction, während bei alkalischer Reaction dasselbe nicht gefällt wird. Bei gewöhnlicher Temperatur ist die Wirkung des Chloroforms eine langsamere.

Das Eiereiweiss wird bei einer Temperatur von 50—55° C. bei der sauren Reaction ziemlich gut, bei der neutralen sehr rasch, bei der alkalischen Reaction gar nicht gefällt. Die Einwirkung von Chloroform auf Eiereiweiss ist auch bei gewöhnlicher Temperatur wahrnehmbar und zwar ist dieselbe stärker als bei den Eiweissstoffen des Blutserums.

Zugleich ersieht man aus diesem Verhalten, dass die Eigenschaft des Chloroforms, Blutfarbstoff zu fällen, zur quantitativen Bestimmung des Blutfarbstoffes direkt nicht benützt werden kann, da eben auch andere Eiweissstoffe mitgefällt werden.

Lässt man Chloroform auf Methämoglobin einwirken, so wird dasselbe schon bei gewöhnlicher Temperatur gefällt; bei Temperaturen von 50—55° C. ist die Einwirkung eine noch raschere.

Es kann aber dieses Verhalten wohl zum qualitativen Nachweise des Blutfarbstoffes dienen, besonders in solchen Fällen, wo eine kleine Menge Blutfarbstoff in einer grosse

Menge Flüssigkeit enthalten ist, so z. B. im Harn. Man kann durch Chloroform den Blutfarbstoff fällen und den Niederschlag, da sich derselbe gewöhnlich schlecht absetzt, durch Zusatz von etwas Calciumchlorid und phosphorsaurem Natron zum Absetzen bringen, einige Male mit Wasser waschen, filtriren, dann im Wasser unter Sodazusatz auflösen, die Lösung filtriren und spectroscopisch untersuchen.

Noch vortheilhafter kann man aber diese Eigenschaft des Chloroforms in der präparativen Chemie benützen, wenn man aus einer Flüssigkeit, die man nicht erhitzen darf, Blutfarbstoff entfernen will. Hierbei ist die Benützung des Chloroforms besonders vortheilhaft, weil dasselbe aus dem Filtrate sehr leicht entfernt werden kann, schon durch Durchleiten von Luft, durch schwaches Erwärmen, besonders im Vacuum.

Weiter wurde auch das Verhalten des Chloralhydrats zum Blutserum, Eiereiweiss und Blutfarbstoff geprüft.

Das Eiereiweiss wird bei saurer Reaction von Chlorhydrat nicht gefällt, bei neutraler Reaction entsteht ein schwacher, bei alkalischer Reaction ein starker Niederschlag, wobei sich Chloroform entwickelt. Ganz analog verhält sich das Chloralhydrat zu den Eiweissstoffen des Blutserums.

Was das Verhalten des Chloralhydrats zum Oxyhämoglobin anbelangt, so wird dasselbe mit Chloralhydrat gefällt; der Niederschlag kann nach dem Entfernen des Chloralhydrats im Wasser unter Zusatz von 1—2 Tropfen Soda gelöst und in der Lösung das Oxyhämoglobin spectroscopisch nachgewiesen werden.

Das Bromoform verhält sich dem Chloroform ganz analog, nur ist die Einwirkung seiner schweren Flüchtigkeit zufolge eine langsamere.

Im December vorigen Jahres erschien eine Arbeit des Herrn Dr. V. Arnold,¹⁾ in welcher es heisst: «Im Gegensatz zum Oxyhämoglobin wird aber das Methämoglobin durch viel unbedeutendere Eingriffe in derselben Richtung verändert. Es

¹⁾ Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes. Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 78—85.

genügt ein mehrmaliges Schütteln mit Chloroform, um braune Färbung einer Methämoglobinlösung in Hellroth umzuwandeln und den Blutfarbstoff als neutrales Hämatin auszufällen. Fügt man jetzt etwa $\frac{1}{3}$ Volumen Alkohol hinzu, so wird — nachdem man die Eprouvette einmal umgewendet hat — das ausgefällte Hämatin durch das anhaftende Chloroform in Gestalt eines schön rothen Niederschlages zu Boden gerissen. Man kann dieses sehr charakteristische Verhalten einer Methämoglobinlösung recht gut — wie ich an anderer Stelle ausführlicher mittheilen will — zum qualitativen Nachweis desselben, z. B. im Harn, benützen. Dieser rothe Niederschlag besitzt die Eigenschaften ausgefällten neutralen Hämatins, rothe Farbe, vollständige Unlöslichkeit in kaltem oder auf 35°C. erwärmtem destillirten Wasser, charakteristisches Spectrum des neutralen Hämatins u. s. w. Im Gegensatz zum Methämoglobin zeigt eine mit Chloroform geschüttelte Oxyhämoglobinlösung in derselben Zeit (ja sogar nach 24 Stunden) keine sichtbare Veränderung.»

Hierzu wäre Folgendes zu bemerken:

1. Der Verfasser glaubt, dass Oxyhämoglobinlösungen durch Schütteln mit Chloroform nicht gefällt werden. Diese Beobachtung bezieht sich offenbar auf Zimmertemperatur, wobei das Chloroform nur wenig auf das Oxyhämoglobin einwirkt, dasselbe jedoch bei längerer Einwirkung zum Theile fällt. Erwärmt man aber eine Oxyhämoglobinlösung auf etwa 50°C. und schüttelt, so wird das Oxyhämoglobin vollkommen gefällt.

2. Der Verfasser hält den Chloroformniederschlag für neutrales Hämatin. Hierzu wäre zu bemerken, dass das Hämatin 9,46% Stickstoff (Nencki-Sieber), während der Chloroform-Niederschlag, wie oben angeführt, 16% Stickstoff enthält und für eine Mischung von gefällttem Blutfarbstoff und anderen Eiweissstoffen des Blutes gehalten werden muss. Es unterliegt daher keinem Zweifel, dass dieser Körper kein Hämatin ist.

3. Mischt man eine Oxyhämoglobinlösung mit concentrirter Kochsalzlösung und Alkohol, so verhält sich diese Lösung

dem «neutralen Hämatin» Arnold's ganz analog: gibt die zwei von ihm beschriebenen Absorptionsstreifen, färbt sich beim Erwärmen braun und gibt dann ein Spectrum, welches demjenigen des alkalischen Hämatins ähnlich ist.

Man sieht also, dass das «neutrale Hämatin» Arnold's auch ohne Chloroform erhalten werden kann.

Zur Kenntniss der Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen.

Von

Justus Anderssen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Christiania.)

(Der Redaction zugegangen am 7. Mai 1900.)

Ueber das Vorkommen und den Nachweis des Rohrzuckers in den Pflanzen hat in dieser Zeitschrift neuerdings E. Schulze, z. Theil im Verein mit S. Frankfurt¹⁾ ausführliche Untersuchungen veröffentlicht, in denen gezeigt wird, dass genannte Zuckerart im Pflanzenreiche sehr häufig vorkommt, so häufig, dass es sogar als möglich bezeichnet wird, dass der Rohrzucker in den Blütenpflanzen nicht viel weniger verbreitet sei als das Stärkemehl.

Die Untersuchungen Schulze's, sowie fast aller früheren Forscher, die ihre Aufmerksamkeit auf das Vorkommen des Rohrzuckers gelenkt haben, beziehen sich fast ausschliesslich auf höhere Pflanzen. «Wie es mit dem Rohrzucker in den Kryptogamen steht, wissen wir nicht» (Schulze).²⁾

Es liegen in der That, soweit ich aus der mir zugänglichen Litteratur habe entnehmen können, jedenfalls nur sehr sparsame Angaben über Rohrzucker bei kryptogamen Pflanzen vor, und sichere Schlüsse über das Vorkommen dieses Zuckers lassen sich ausserdem aus den Angaben der älteren Litteratur häufig nicht ziehen, da meistens nur von «Zucker» oder «Süsstoff», ohne nähere Charakterisirung der betreffenden Substanz, als Bestandtheil verschiedener Pflanzen, gesprochen wird.

1) Diese Zeitschr., Bd..XX, S. 511 (1895) und Bd. XXVII, S. 267 (1899).

2) L. c. L. Bd. XX, S. 543 Fussnote.

In den Thallophyten scheint der Rohrzucker noch nicht nachgewiesen zu sein. Das Vorkommen bei den Moosen ist sehr zweifelhaft: Saccharose ist bei den Moosen «als Bestandtheil vielleicht anzusehen» (Husemann und Hilger).¹⁾ Sichere Angaben habe ich nur über die Lycopodiumsporen und die Engelsüsswurzel finden können. Aus den erwähnten Sporen stellte Langer²⁾ den Zucker in Krystallen dar, die in wässriger Lösung die spezifische Drehung $(\alpha)_D = +66,4$ zeigten und somit als Rohrzucker identificirt wurden, und über Polypodium vulgare, in dessen Wurzel schon Rebling³⁾ 5% «Zucker» gefunden hatte, bemerkt Flückiger⁴⁾: der bald mit Mannit, bald mit Glycyrrhizin verglichene Zucker ist ein Gemenge von unkrystallisirbarem Zucker und Rohrzucker, woraus letzterer erst nach längerer Zeit anschießt.

In Betreff der Farnen wird in der älteren Litteratur mehrfach angegeben, dass Aspidium Filix mas Zucker enthalte, dessen Natur zwar nicht festgestellt wurde, den Beschreibungen nach aber mit Wahrscheinlichkeit als Rohrzucker anzusehen ist. Schon in den ersten, aus den zwanziger Jahren stammenden Untersuchungen des Rhizoms dieser Pflanze wird ein hoher Procentgehalt an «süßem Extractivstoff» angegeben.⁵⁾ Der einzige Untersucher, der diesen «Süßstoff» näher beschreibt, ist Bock,⁶⁾ der ihn in krystallinischem, aber noch sehr unreinem Zustande «Krystallhäufchen von der Farbe des braunen Kandiszuckers» gewann und als Rohrzucker oder damit nahe verwandt bezeichnet; «durch seine Krystallisirbarkeit und Verhalten gegen Säuren und Alkalien schließt sich dieser Zucker dem Rohrzucker an». Die Zuckermenge wird zu 11% angegeben — wahrscheinlich viel zu hoch. In den Blattwedeln von Aspidium Filix mas konnte

1) Nach Husemann und Hilger, Pflanzenstoffe, II. Aufl., S. 323.

2) Archiv d. Pharmacie, Bd. 27, 1889, S. 302.

3) Ibidem. Bd. 134, 1855, S. 11.

4) Lehrb. d. Pharmakognosie 1867, S. 155.

5) Vgl. die in Pfaff's System der Materia medica citirten Analysen von Gebhardt.

6) Archiv f. Pharmacie, 1851, S. 271—272.

Bock keinen Zucker nachweisen, ebensowenig wie im Rhizom von *Asplenium Filix femina*.

Bei Gelegenheit der im hiesigen pharmakologischen Institut angestellten, z. Th. schon anderweitig veröffentlichten Untersuchungen über die chemischen Bestandtheile verschiedener Farnrhizome war Herr Professor Poulsson auf die Vermuthung gekommen, dass der Rohrzucker in den Farnen kein seltener Bestandtheil sei, und hatte diesen Zucker aus *Rhizoma Filicis* schon in reinen Krystallen und in beträchtlicher Menge dargestellt. Da, wie aus dem Obenstehenden ersichtlich sein dürfte, unsere Kenntnisse über die Verbreitung des Rohrzuckers in den Kryptogamen noch sehr lückenhaft sind, übernahm ich gern die Fortsetzung und Ausdehnung dieser Untersuchungen auf andere Farnen und werde nachstehend die Resultate mittheilen.

Um im Folgenden Wiederholungen zu vermeiden, will ich gleich bemerken, dass zur Gewinnung des Zuckers die von Schulze angegebene Methode befolgt wurde, d. h. es wurden die getrockneten und gepulverten mittels Aether entfetteten Rhizome mit 90—91 %igem Alkohol — unter Zusatz von ein wenig gebrannter Magnesia oder Calciumcarbonat, um der Inversion des Zuckers durch eventuell vorhandene Säuren vorzubeugen — ausgekocht, der alkoholische Auszug in der Wärme mit heisser Strontianlösung gefällt, der abfiltrirte Niederschlag nochmals mit Strontianlösung behandelt und nach erneutem Filtriren schliesslich mit Kohlensäure zerlegt. Das in dieser Weise erhaltene braun gefärbte Filtrat wurde zur Syrupsconsistenz oder fast zur Trockne eingedampft und mit Alkohol gekocht. Aus der alkoholischen Lösung schieden sich oft rasch, oft aber sehr langsam oder erst nach wiederholtem Eindampfen und Ausziehen des Rückstandes mit Alkohol die Zuckerkrystalle aus. Zur Identificirung des Rohrzuckers diene, wo die erhaltenen Quantitäten dazu hinreichend waren, die Polarisationsprobe. Oft wurden aber nur sehr kleine Mengen erhalten. Das charakteristische Aussehen und der intensiv süsse Geschmack der Krystalle, der positive Ausfall der Seliwanoff'schen Reaction (Rothfärbung der Lösung und nach-

heriges Ausscheiden brauner Flocken beim Kochen mit Resorcin und Salzsäure), sowie das Verhalten der Fehling'schen Lösung oder der Schmiedeberg'schen Mannitkupferlösung gegenüber vor und nach Inversion mit verdünnter Salzsäure mussten in diesen Fällen zum Nachweis des Rohrzuckers genügen.

***Aspidium Filix mas* Sw.**

Von dem Besitzer der hiesigen Apotheke «Orion», Herrn Gustav Hansen, wurde mir ein grosses Quantum des gepulverten mit Aether behufs Bereitung des officinellen Extractes erschöpften Rhizoms zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung reichlicher Mengen Rohrzuckers gelang sehr leicht. Es wurde einfach das stark süß und zu gleicher Zeit adstringierend schmeckende Pulver mit 90%igem Alkohol ausgekocht und die alkoholische Lösung nach Abfiltrirung eines schon nach wenigen Stunden ausgeschiedenen amorphen Niederschlages im verschlossenen Kolben bei niedriger Temperatur stehen gelassen.

Im Laufe einiger Tage setzten sich in reichlicher Menge harte, braune, an den Wänden festhaftende Krystalle von dem charakteristischen Aussehen des Rohrzuckers ab. Sie wurden mit Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt, und dann die wässrige Lösung stark eingengt. Der aus dem Syrup erhaltene alkoholische Auszug lieferte nun vollständig farblose und reine Krystalle.

Eine wässrige Lösung, in 25 ccm. 2,1430 g Substanz enthaltend, drehte im 200 mm. Rohr $11,35^\circ$ nach rechts. Es berechnet sich daraus $(\alpha)_D = + 66,2$.

***Aspidium spinulosum* Sw.**

Der alkoholische Auszug des entfetteten Rhizomes lieferte schon beim Stehenlassen in der Kälte Rohrzuckerkrystalle, jedoch nur in sehr geringer Quantität. Er wurde daher mit Strontianlösung versetzt, und die dadurch entstandene voluminöse seifenähnliche und schwer abfiltrirbare Fällung wie oben angegeben weiterbehandelt. Die Ausbeute an schliesslich erhaltenen reinen Krystallen war erheblich geringer als bei *Aspidium Filix mas*.

Eine wässerige Lösung, die in 25 ccm. 1,085 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm. Rohr 5,75° nach rechts. (α)_D demnach = + 66,24.

***Aspidium angulare* Kit.**

Rohrzucker scheint im Wurzelstock, aber nur in sehr geringer Menge, enthalten zu sein. Aus 270 g des getrockneten Rhizoms erhielt ich nur wenige Centigramme Krystalle, die das Aussehen unreinen Rohrzuckers besaßen, in Wasser gelöst die Resorcin-Salzsäurereaction gaben und erst nach Kochen mit verdünnter Säure die alkalische Kupferlösung reducirten.

***Aspidium marginale* Sw.**

Dieser im östlichen Nordamerika einheimische Farn, der in die Pharmacopoea U. S. aufgenommen ist, enthält nach Patterson¹⁾ Glucose und Rohrzucker. Ich vermag diese Angabe nicht zu bestätigen. Das mit Aether extrahierte Rhizompulver besitzt keinen süßen Geschmack, und es gelang mir trotz vieler Versuche und Anwendung reichlicher Quantitäten des Ausgangsmaterials ebensowenig Krystalle, wie einen süßen Syrup zu gewinnen. Die Behandlung des alkoholischen Auszuges mit Strontianlösung gab auch einen nur sehr sparsamen Niederschlag.

***Asplenium Filix femina* L.**

Rohrzucker ist — entgegen der Angabe von Bock, der in dieser Pflanze keinen Zucker vorfand (siehe oben) — in reichlicher Menge vorhanden. Es gelang durch Strontianfällung u. s. w. leicht Krystalle zu gewinnen, die nach zweimaliger Umkrystallisierung aus Alkohol bei der Polarisierung die spezifische Drehung des reinen Rohrzuckers zeigten.

Eine wässerige Lösung, die in 25 ccm. 0,9661 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm. Rohr 5,125° nach rechts. Daraus berechnet sich (α)_D = + 66,32.

***Struthiopteris germanica* Wild.**

Enthält ebenfalls Rohrzucker.

Ich hatte bei der Untersuchung dieser Pflanze Gelegenheit,

¹⁾ Americ. Journ. of Pharmacy, Vol. XLVII, 4. Ser. Vol. IV, 1875, S. 292. Ref. in Archiv f. Pharmacie, 1876, 8, S. 566.

die Erfahrung Schulze's zu bestätigen, dass der Zucker vor dem Umkrystallisiren zuweilen ein Aussehen besitzt, dass von der gewöhnlichen Form der Rohrzuckerkrystalle bedeutend abweicht. Aus dem alkoholischen Auszug des nach Kohlensäurebehandlung des Strontianniederschlags und Eindampfen des Filtrates resultirenden süßen Syrups schieden sich erst nach mehrwöchentlichem Stehenlassen trianguläre, bis $1\frac{1}{2}$ cm. lange und 2—3 mm. breite, fächerförmig angeordnete, an Rohrzucker gar nicht erinnernde Krystalle aus, die aber schon bei dem ersten Umkrystallisiren aus verdünntem Alkohol das gewöhnliche Aussehen des Rohrzuckers annahmen.

Eine wässerige Lösung, die in 25 ccm. 0,9005 g Substanz enthielt, drehte im 200 mm. Rohr $4,8^{\circ}$ nach rechts. Daraus berechnet $(\alpha)_D = + 66,6$.

***Pteris aquilina* L.**

Die Quantität der aus 175 g des Rhizoms erhaltenen Krystalle war für die polarimetrische Prüfung zu gering. Der positive Ausfall der Resorcinreaction, das Verhalten der Fehling'schen Lösung gegenüber, sowie das Aussehen gestatteten jedoch, die Krystalle als Rohrzucker anzusehen.

***Polypodium vulgare* L.**

Durch Kohlensäurezerlegung des gereinigten Strontian-niederschlags und Eindampfen des Filtrates wurde ein brauner Syrup erhalten, der wie gewöhnlich mit kochendem Alkohol erschöpft wurde. Die Krystallausscheidung ging hier sehr langsam und schwierig von Statten. Selbst nach oft wiederholtem Eindampfen und Wiederaufnahme des dickflüssigen Rückstandes in Alkohol enthielt die Lösung immer noch beträchtliche Mengen einer amorphen, süßschmeckenden Substanz, die sich gallertartig ausschied. Erst nach sechswöchentlichem Stehen kamen kleine rohrzuckerähnliche, die oben öfters erwähnten Reactionen gebende Krystalle zum Vorschein. Die Resultate meiner Untersuchungen decken sich somit mit der Angabe Flückiger's, dass die Engelsüßwurzel neben «unkrystallisirbarem Zucker» noch Rohrzucker enthält.

Weiteres über das Invertin.

Von

Dr. M. Külle.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Mai 1900.)

In seiner Arbeit über das Invertin hat W. A. Osborne¹⁾ gezeigt, dass das von ihm dargestellte Ferment weder eiweiss- noch peptonartiger Natur, sondern vielmehr eine Substanz eigner Art ist, deren stets vorhandener Aschengehalt regellos auf- und abschwankt, daher jedenfalls nur als mechanische Beimengung betrachtet werden darf, während hingegen die Resultate der Elementaranalysen verschiedener Präparate auf eine constante Zusammensetzung des eigentlich wirksamen Körpers und auf das regelmässige Auftreten von Stickstoff unter seinen Bestandtheilen hinweisen. Besonders bemerkenswerth aber war die von Osborne zuletzt angeführte Beobachtung, dass die Substanz beim Erwärmen mit Salzsäure einen reducirenden Körper liefert, somit also vielleicht eine glykosidartige Verbindung ist.

Da Osborne selbst aus Mangel an hinreichendem Material leider nicht mehr im Stande war, die wahre Natur des reducirenden Körpers festzustellen, so habe ich es unternommen, diese Lücke nachträglich auszufüllen.

Die nöthige Menge des gereinigten Stoffs verschaffte ich mir nach dem gleichen Verfahren, das Osborne angewendet und in seiner Arbeit ausführlich beschrieben hat; wobei auch mir als Ausgangsmaterial ein von Merck auf besonderen Wunsch frisch dargestelltes Rohpräparat diente, dargestellt unter Be-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 399.

rücksichtigung der Erfahrungen, von denen bei Osborne die Rede ist. Leider war der Materialverlust, der während und in Folge der Reinigung stattfand, immer sehr bedeutend; denn mit den anorganischen Salzen diffundirte während der mehr-tägigen Dialyse durch die mir zu Gebote stehenden Pergament-schläuche jedesmal auch eine ziemlich reichliche Menge wirk-samer organischer Substanz. Es ergab sich ausserdem, dass die von Merck nacheinander bezogenen Präparate nicht durch-weg die gleiche Beschaffenheit besaßen. Zwar erwiesen sich alle in hohem Grade wirksam, allein die Menge des in Wasser löslichen Antheils und ebenso der Aschengehalt waren bei den einzelnen merklich verschieden, was ja wohl mit der Art und Beschaffenheit der jedesmal verarbeiteten Hefe zusammen-hängen mag.

Auch fand ich, wie aus dem Folgenden hervorgeht, die elementare Zusammensetzung meiner gereinigten Produkte, wenn ich sie auf aschenfreie Substanz berechnete, etwas abweichend von derjenigen der Osborne'schen Präparate; indessen betraf diese Abweichung wesentlich nur den Stick-stoff- und Wasserstoffgehalt, während der mittlere Kohlenstoff-gehalt (44,58%) etwa der gleiche, wie bei Osborne (44,69%) blieb. Dieser Umstand legt den Gedanken nahe, dass das von mir gefundene Plus an Wasserstoff und Stickstoff von dem Ammoniak des bei der Darstellung erzeugten Tripelphosphats herrühren mochte, das, durch Fällung und Dialyse nur unvoll-ständig aus der Lösung entfernt, später zugleich mit der organischen Substanz durch den Alkohol gefällt worden war.¹⁾

Ich analysirte nacheinander 3 verschiedene aus 2 ver-schiedenen Sendungen von Rohmaterial dargestellte Präparate.

¹⁾ Dagegen, dass man diese Erklärung gegen die Annahme eines Stickstoffgehaltes der Substanz überhaupt geltend machen könnte, spricht der Umstand, dass dann, wie eine einfache Rechnung zeigt, auch der Wasserstoffgehalt stark herabgedrückt werden würde und zwar bis unter 5% — so dass derselbe keineswegs mehr dem des Traubenzuckers (6,6%), ja nicht einmal dem der Stärke oder des Glykogens (6,17%) gleichkäme —, ein Umstand, der der sonstigen Natur der untersuchten Substanz durchaus widerspräche.

1. Aschenbestimmung.

Präparat I: 1,0225 g trockner Substanz hinterliessen 0,0632 g Asche, entsprechend 6,18%.

Präparat II: 1,9556 g trockner Substanz hinterliessen 0,0776 g Asche, entsprechend 3,96%.

Präparat III: 1,091 g trockner Substanz hinterliessen 0,1166 g Asche, entsprechend 10,68%.

Die Asche bestand aus Phosphorsäure, Kalium und Magnesium. Von Eisen habe ich keine Spur gefunden.

2. Elementaranalyse.

- I. 0,1960 g trockner Substanz, enthaltend 0,0121 g Asche, lieferten 0,1145 g Wasser und 0,302 g Kohlensäure.
- II. a) 0,1978 g trockner Substanz, mit 0,0078 g Asche, lieferten 0,1255 g Wasser und 0,3146 g Kohlensäure.
b) 0,1545 g trockner Substanz, mit 0,0061 g Asche, lieferten 0,0950 g Wasser und 0,2484 g Kohlensäure.
- III. a) 0,2601 g trockner Substanz, mit 0,0278 g Asche, gaben 0,1510 g Wasser und 0,3807 g Kohlensäure.
b) 0,2525 g Trockensubstanz, mit 0,0269 g Asche, gaben bei 11,5° und 730 mm. Bar. 16,5 ccm. Stickstoff.
c) 0,2140 g Trockensubstanz, mit 0,0228 g Asche, gaben 0,1206 g Wasser und 0,3115 g Kohlensäure.
d) 0,3530 g Trockensubstanz, mit 0,0377 g Asche, gaben bei 10° und 732 mm. Bar. 23,5 ccm. Stickstoff.
e) 0,2135 g Trockensubstanz, mit 0,0353 g Asche, gaben bei 16° und 733 mm. Bar. 21,5 ccm. Stickstoff.

Es ergibt sich sonach für die verschiedenen Präparate folgende procentische Zusammensetzung:

Nummer des Präparates	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff	Asche	Bemerkungen
I	44,73 %	6,91 %	—	6,18 %	} Ueber Schwefelsäure im Vacuum bei Zim- mertemperatur ge- trocknet.
II	45,15 %	7,34 %	—	} 3,96 %	
	45,65 %	7,22 %	—		
	44,69 %	7,22 %	8,46 %	} 10,68 %	} Im Vacuum bei 80° ge- trocknet. Bei 105° im Wasserstoff- strom getrocknet.
III	44,43 %	7,00 %	8,67 %		
	43,90 %	6,45 %	8,32 %		

Ueber die Ausführung der Analysen sei bemerkt, dass ich die Substanz stets mit etwas dichromsaurem Kali und chromsaurem Blei gemengt im Schiffchen verbrannte, und in Betreff des vorherigen Trocknens der Substanz, dass ich einzelne Proben bei Zimmertemperatur im Vacuum über Schwefelsäure, andere im Vacuum bei höherer Temperatur (80°), wieder andere im Wasserstoffstrom im Toluolbade bei 105° getrocknet habe. Im ersten wie im letzteren Falle wurde das Gewicht der Substanz je nach der Menge derselben erst nach 3 bis 6 Wochen, im zweiten dagegen schon nach 5 bis 6 Tagen constant. Bemerkenswerth war dabei der Umstand, dass während des langen Trocknens im Toluolbade das Präparat sich bräunte und auch eine deutliche Einbusse an Wirksamkeit erlitt, was bei den andern Trocknungsarten keineswegs der Fall war.

Die Asche wurde von jedem Präparat besonders bestimmt. Es geschah dies nach der bekannten Methode von Strecker.¹⁾

Ich liess also zunächst 1 bis 2 Grammen der Substanz bei ganz schwacher Flamme und ohne Rothgluth im Porzellantiegel verkohlen, setzte dann soviel einer frisch bereiteten und titrirten, concentrirten Lösung von Aetzbaryt hinzu, dass mindestens um die Hälfte mehr Baryumoxyd vorhanden war, als die in der Asche enthaltene Phosphorsäure (in der Regel 50%) zu binden vermochte, dampfte die Lösung zur Trockne ein und erhitzte endlich den Rückstand 12 Stunden lang bei eben beginnender Rothgluth in der Muffel. Um etwa vorhandenes Baryumoxyd in das Carbonat überzuführen, wurde die Asche zuletzt mit Ammoniumcarbonat befeuchtet und nochmals während kurzer Zeit in der Muffel erhitzt. Am Ende wurde die Gesamtasche gewogen, die Kohlensäure nach Kolbe²⁾ bestimmt und ebenso wie die bekannte Menge des zugefügten Baryumoxyds (BaO) vom Gesamtgewichte abgezogen.

Wirksamkeit. Waren die Präparate im Vacuum über Schwefelsäure nur bei Zimmertemperatur getrocknet, so erwiesen sie sich jedesmal in höchstem Grade wirksam. Um eine genauere Vorstellung von dem Grade dieser Wirksamkeit zu erhalten, löste ich 0,01 g davon in 5 ccm. Wasser und brachte 1 Tropfen dieser Lösung zu 10 ccm. einer 1%igen Rohrzuckerlösung. Nachdem ich die Mischung etwa $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 30° sich selbst überlassen, prüfte ich sie mit Fehling'scher Flüssigkeit und fand sofort eine reichliche Ausscheidung von Kupferoxydul.

Da auf 5 ccm. Wasser, wie oben bemerkt, 0,01 g, daher auf 1 ccm. 0,002 g des Präparats kamen, da ferner 1 ccm.

¹⁾ Liebig's Ann., Bd. 73, S. 366.

²⁾ Fresenius, Quant. Anal. I, 449.

meines Messgefäßes 19 Tropfen gab, so enthielt ein einzelner Tropfen der Lösung also nur $\frac{0,002}{19} = 0,00011$ g fester Substanz.

Um Klarheit über die Natur des reducirenden Körpers zu gewinnen, den Osborne beim Erwärmen unseres Invertinpräparats mit Salzsäure gefunden hatte, wandte auch ich als Zersetzungsmittel zunächst Salzsäure an.

5 g reines, im Vacuum bei gewöhnlicher Temperatur getrocknetes Invertin wurde in Portionen von je 1 g mit je 15 ccm. gewöhnlicher verdünnter Salzsäure in Röhren eingeschlossen und diese im Wasserbad bei Siedehitze so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit dunkelbraun gefärbt und eine ungefähr 1 cm. hohe, lockere Schicht schwarzer Huminsubstanzen abgeschieden war. Bei frisch bereitetem Invertin war hierzu eine Erhitzungsdauer von mindestens 10, bei älteren Präparaten nur eine solche von ungefähr 2 bis 3 Stunden erforderlich. Nach dem Oeffnen der Röhren wurde die Flüssigkeit von der geringen Menge Huminsubstanz abfiltrirt und in das Filtrat unter kräftigem Schütteln desselben allmählich so viel frisch aufgeschlämmtes Kupferoxydul eingetragen, bis das gebildete Kupferchlorür röthlich gefärbt erschien. Dann ward abermals filtrirt und das etwa gelöste Kupfer aus der Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff entfernt. Endlich wurde der vom Schwefelkupfer befreiten Flüssigkeit kohlensaures Baryum bis zur schwach sauren Reaction zugefügt, das Ganze im Vacuum zum dicken Syrup eingedampft und dieser in einen grossen Ueberschuss 96%igen Alkohols (etwa 15 ccm. auf ein Liter Alkohol) eingegossen. Der Alkohol wurde nach mehrstündigem Stehen von ausgeschiedenem Chlorbaryum wiederum abfiltrirt und gleichfalls im Vacuum zum Syrup eingedampft. Dieser letztere besass ein starkes Reductionsvermögen und diente nunmehr unmittelbar zur Isolirung des reducirenden Körpers.

Zu diesem Zwecke löste ich ihn in ca. 150 ccm. Wasser und versetzte ihn mit einer zuvor erhitzten Lösung von 2 g salzsauren p-Bromphenylhydrazins und 3 g essigsauren Natriums in 60 ccm. Wasser. Nach einigem Stehen in der Kälte, bei späteren Versuchen sofort, schied sich nun eine röthlich-weiße

Verbindung aus, die abgesaugt, mit warmem Wasser, dann mit Alkohol und Aether gewaschen und zuletzt aus viel siedendem, 60%igem Alkohol umkrystallisirt werden konnte. Sie stellt dann eine aus seidenglänzenden Täfelchen bestehende Krystallmasse dar, die bei raschem Erhitzen, d. h. bei einer innerhalb 3 Minuten bewirkten Steigerung der Temperatur von 20 bis 195° (nach Emil Fischer), bei 208—210° schmolz.

Die Krystalle waren wenig löslich in heissem Wasser, Benzol, Aether, Essigester, absolutem Alkohol und unlöslich in Chloroform, leicht löslich dagegen in heissem Eisessig. Liess ich eine Spur derselben mit verdünnter Kalilauge an der Luft stehen, so trat daran nach einiger Zeit eine rosenrothe Färbung auf.

Bildungsweise, Schmelzpunkt, Löslichkeitsverhältnisse, alle diese Umstände zusammen, ebenso wie die nachstehend angeführten Resultate der Analyse kennzeichnen die Verbindung als das p-Bromphenylhydrazon der Mannose.¹⁾

1. 0,2096 g Substanz gaben 0,0955 g Wasser und 0,3175 g Kohlensäure.

2. 0,1740 g Substanz gaben bei 15,5° und 725 mm. Bar. 12,6 ccm. Stickstoff.

3. 0,3054 g Substanz gaben bei 8° und 721 mm. Bar. 21,8 ccm. Stickgas.

4. 0,1526 g Substanz lieferten bei der Brombestimmung nach Carius 0,0817 g Bromsilber, entsprechend 0,0347 g Brom.

Berechnet für $C_{11}H_{17}BrN_2O_6$:

Gefunden:

		I	II
Kohlenstoff	41,26%	41,31%	—
Wasserstoff	4,87%	5,06%	—
Stickstoff	8,02%	8,05%	8,16%
Brom	22,92%	22,74%	—

Ich gewann im Ganzen aus den angewandten 5 g meines Invertins 1,5 g reines Hydrazon.

Da Mannose die einzige Zuckerart ist, die schon in der Kälte ein unlösliches Hydrazon auch mit Phenylhydrazin liefert, so wurde in einem zweiten Versuche der nach dem beschriebenen

¹⁾ W. Naumann, Ueber einige Hydrazone etc. Inauguraldissertation. Wurzen 1892, S. 14.

Verfahren erhaltene Syrup zum Zwecke der Kontrolle in der von E. Fischer¹⁾ vorgeschriebenen Weise mit salzsaurem Phenylhydrazin und essigsauerm Natrium in der Kälte behandelt. Schon nach kurzem Stehen schied sich das erwartete Hydrazon aus. Nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser stellte es eigenthümlich röthliche Blättchen dar, deren Schmelzpunkt zwischen 195 und 200° lag, also mit dem von E. Fischer angegebenen übereinstimmte.

Auch die Stickstoffbestimmung führte zu dem gleichen Resultate.

0,1558 g Substanz gaben bei 13° und 722 mm. Bar. 15,8 ccm. Stickgas.

Berechnet für $C_{12}H_{16}N_2O_6$:
Stickstoff 10,37 %

Gefunden:
10,42 %

Wendet man anstatt der Salzsäure als Zersetzungsmittel die gewöhnliche verdünnte Schwefelsäure an, so erhält man zuletzt als eines der Spaltungsprodukte gleichfalls Mannose. Um dies zu beweisen, kocht man etwa 1 g des Präparats mit 30 ccm. der genannten Säure in einem mit Steigrohr versehenen Kölbchen etwa einen Tag lang über dem Drahtnetze, filtrirt am Ende von der ausgeschiedenen Trübung ab, verdünnt das Filtrat mit Wasser und digerirt es auf dem Wasserbade mit aufgeschwemmtem kohlensauren Baryum so lange, bis die Reaction neutral geworden. Hierbei pflegt das Ganze jene eigenthümliche Orangefarbe anzunehmen, die Schmiedeberg²⁾ als charakteristisch für das basisch glykuronsaure Baryum bezeichnet hat.

Alsdann filtrirt man vom schwefelsauren und vom Ueberschuss des kohlensauren Baryums ab, wäscht den weissen Niederschlag gut aus, dampft das Filtrat im Vacuum bis zu einem geringen Volumen ein, wobei stets ein weiterer Nieder-

¹⁾ Ber. d. d. chem. Gesellsch. Bd. 20, S. 832 und Bd. 22, S. 1155.

²⁾ Archiv für experiment. Pathol. und Pharmacol., Bd. 28, S. 355.
Die weitere Untersuchung hat nun freilich gezeigt, dass das Reduktionsvermögen des Reaktionsproduktes in unserem Falle nicht von der Anwesenheit von Glykuronsäure, sondern von der Mannose herrührte, die sich in der gelb gefärbten Lösung befand.

schlag ausfällt, und giesst endlich den Rest sammt diesem letzteren Niederschlage in viel Alkohol ein. Nachdem das Ganze einige Stunden ruhig gestanden, filtrirt man von Neuem, wobei ein weisser Rückstand auf dem Filter bleibt, und dampft endlich das alkoholische Filtrat wieder im Vacuum zum Syrup ein. Aus diesem lässt sich das p-Bromphenylhydrazon der Mannose in der gleichen Weise gewinnen, wie oben beschrieben.

Das Verfahren, mit Schwefelsäure zu kochen, ist einfacher als das erste und bietet den Vorthail, dass dabei der Zucker in völlig neutraler, salzfreier Lösung erhalten wird; zugleich aber erweckt es einige Hoffnung, dass es zur Isolirung noch weiterer Spaltprodukte unseres Präparates wird führen können. Der zuletzt erwähnte weisse Niederschlag nämlich enthielt zwar noch Reste von schwefelsaurem und kohlensaurem Baryum, die beide offenbar von der organischen Substanz in Lösung zurückgehalten worden waren, er war aber zugleich auch stickstoffhaltig.

Ueber die Bestimmung der Oxalsäure und das Vorkommen von Oxalsäure im Harn.

Von

E. Salkowski.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 31. Mai 1900.)

Wer sich einmal mit Versuchen zur Bestimmung der Oxalsäure im Harn beschäftigt hat, wird mir darin beistimmen, dass die bis jetzt bekannten Methoden recht unbefriedigend sind. Die am meisten angewendete, die Neubauer'sche, ist nicht allein äusserst unerquicklich in der Ausführung, sondern auch, wie ich im Folgenden zeigen werde, durchaus unzureichend. Ausserdem wird sie in verschiedenen Handbüchern verschieden beschrieben.

Neubauer selbst hat sie in der 6. Auflage seiner Harnanalyse im Jahre 1872 folgendermassen beschrieben (Seite 115, 116 und 216):

• Mit absoluter Sicherheit gelingt der Nachweis aufgelösten oxalsäuren Kalks in folgender Weise: den zu prüfenden Urin (400—600 ccm.) versetzt man mit Chlorcalciumlösung, übersättigt mit Ammon und löst den entstandenen Niederschlag in Essigsäure, wobei man einen Ueberschuss möglichst vermeidet. Nach 24 Stunden bringt man den entstandenen Niederschlag, in welchem Harnsäure selten fehlen wird, auf ein kleines Filter, wäscht mit Wasser und übergiesst ihn darauf mit einigen Tropfen Salzsäure. Etwa vorhandenes Kalkoxalat löst sich auf, die Harnsäure bleibt auf dem Filter zurück. Das Filtrat verdünnt man in einer Proberöhre mit 15 ccm. Wasser und überschichtet es mittelst einer Pipette höchst vorsichtig mit sehr verdünntem Ammon in genügender Menge. In der Ruhe mischen sich die Flüssigkeiten

allmählich, nach 24 Stunden wird sich alles vorhandene Kalkoxalat am Boden angesammelt haben und unter dem Mikroskop die schönsten Quadratoctaëder in Masse zeigen.»

Seite 216 heisst es dann:

«Zur quantitativen Bestimmung kann man dieselbe Methode befolgen. Nach 24stündigem Stehen bringt man den ausgeschiedenen oxalsauren Kalk auf ein kleines Filter von bekanntem Aschengehalt, wäscht aus, trocknet und führt durch starkes Glühen den oxalsauren Kalk in Aetzkalk über. Die gefundene Menge Aetzkalk gibt multiplicirt mit 1,607 die entsprechende Menge Oxalsäure.»

Diese Angaben haben offenbar bei Hoppe-Seyler Bedenken erregt. Er schreibt unter Bezugnahme auf die citirte Stelle bei Neubauer in seinem Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse, 4. Auflage (1875), Seite 328:

«Zum Nachweis oder zugleich Bestimmung der Oxalsäure im Harn versetzt man nach der Methode von Neubauer 400 bis 600 ccm. mit etwas Chlorcalcium, dann mit überschüssigem Ammon, filtrirt,¹⁾ behandelt den Niederschlag mit Essigsäure unter Vermeidung eines zu grossen Ueberschusses, filtrirt nach 24stündigem Stehen ab, wäscht mit Wasser, übergiesst ihn mit Salzsäure» u. s. w. Das weitere Verfahren ist dann mit Fortlassung einiger Einzelheiten wie bei Neubauer beschrieben.

Der Unterschied in den Angaben ist also der, dass Hoppe-Seyler den durch Chlorcalcium und Ammoniak erzeugten Niederschlag abfiltriren und dann für sich weiter bearbeiten lässt, in der Annahme, dass dieser Niederschlag die Oxalsäure enthalte, während nach dem Wortlaut bei Neubauer der durch die genannten Reagentien erzeugte Niederschlag ohne Trennung vom Harn wieder gelöst werden soll. Hoppe-Seyler hat offenbar gegen den ursprünglichen Wortlaut Bedenken gehabt und angenommen, dass Neubauer nur versäumt habe, das Filtriren zu erwähnen.

1) Im Original nicht gesperrt.

In der That ist auch der Sinn des Neubauer'schen Verfahrens schwer abzusehen. Bearbeitet man den Harn nach seiner Vorschrift, so unterscheidet er sich von dem ursprünglichen Harn durch folgende Momente: 1) die genuine Acidität ist durch Essigsäure ersetzt; 2) der Harn enthält mehr Calcium als vorher; 3) er enthält mehr Ammonsalz als vorher. Es ist nicht abzusehen, wie diese Momente die Abscheidung von oxalsaurem Kalk begünstigen sollen, womit ich übrigens nicht bestreiten will, dass in manchem Harn, welcher spontan beim Stehen keinen oxalsauren Kalk abscheidet, durch das Neubauer'sche Verfahren eine solche Ausscheidung herbeigeführt werden kann.

In der 5. Auflage von Hoppe-Seyler und ebenso in der neuesten (6.), in Gemeinschaft mit Thierfelder herausgegeben (1893), ist die angegebene Fassung beibehalten worden. Dennoch liegt dem ursprünglichen Neubauer'schen Wortlaut kein Versehen oder Druckfehler zu Grunde, denn er kehrt in der 7. Auflage (1876) und allen folgenden von Huppert besorgten Auflagen wieder, so auch in der 9. mit der von Fürbringer angegebenen Ausführungsform und der wesentlichen Verbesserung von Czapek, nach welcher namentlich der schliesslich durch Ammon erhaltene Niederschlag nochmals mit Essigsäure behandelt wird, was durchaus nöthig erscheint, um Verunreinigungen des oxalsauren Kalks mit phosphorsaurem zu vermeiden.

Wir haben also zwei wesentlich verschiedene Ausführungsformen des Neubauer'schen Verfahrens, und die blosser Angabe, dass die Bestimmungen nach Neubauer gemacht seien, genügt, streng genommen, nicht, indessen wird man, seit Fürbringer die genannte Methode in umfangreicher Weise angewendet hat, wohl annehmen dürfen, dass überall, wo nichts Besonderes bemerkt ist, die ursprüngliche Neubauer'sche Methode angewandt worden ist.

Ist nun die im Hoppe-Seyler'schen Handbuch angegebene Abänderung berechtigt? Diese Frage ist zu verneinen. So plausibel auch die Abänderung erscheint, ist sie doch nicht richtig. Ich habe schon vor einer Reihe von Jahren

angegeben,¹⁾ dass, wenn man einen Harn zur Bestimmung des Kreatinins mit Kalkmilch und Chlorcalcium fällt und filtrirt, im Filtrat sich stets Oxalsäure findet, diese Angabe auch in die erste Auflage meines «Practicum der physiologischen Chemie» (1893) aufgenommen (Seite 210).²⁾ Es war darnach von vornherein anzunehmen, dass dieses auch der Fall sein wird, wenn man den Harn mit Chlorcalcium und Ammoniak fällt. Dem ist in der That so. Das Filtrat enthält in diesem Fall Oxalsäure, wovon ich mich nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren überzeugt habe. Man verliert also nach der Hoppe-Seyler'schen Modification auf alle Fälle Oxalsäure, dieselbe ist daher zu verwerfen. Sie würde vielleicht richtige Resultate geben, wenn man den Niederschlag vor dem Filtriren tagelang stehen lässt.

Kann man nun von dem Neubauer'schen Verfahren einigermassen sichere Zahlenwerthe erwarten?

Neubauer selbst sagt darüber an der bereits citirten Stelle 6. Auflage der Harnanalyse S. 115.

«Mit absoluter Sicherheit gelingt der Nachweis» u. s. w. Andererseits heisst es auf der folgenden Seite:

«Ich habe nach dieser Methode häufig im Urin ziemliche Mengen von Kalkoxalat in Lösung nachweisen können, wenn im Sediment keine Spur davon zu entdecken war, ebenso häufig aber habe ich auch normale Urine mit negativem Resultate auf Kalkoxalat geprüft, sodass es mir immer noch zweifelhaft bleibt, ob man die Oxalsäure zu den normalen oder abnormen Bestandtheilen des menschlichen Urins rechnen muss.»

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. X, S. 121 (1886).

2) Huppert hat diese Angabe auch aufgenommen (Analyse des Harns, 10. Auflage, S. 206), seine Beschreibung könnte indessen leicht missverstanden werden. Er sagt: «nach Salkowski soll man (200 ccm.) Harn mit Kalkmilch neutralisiren oder ganz schwach alkalisch machen, mit Chlorcalcium ausfällen, die Flüssigkeit über dem Niederschlag eindampfen...» Das könnte leicht so verstanden werden, als ob die Flüssigkeit sammt dem Niederschlag eingedampft werden soll; meine Angabe geht jedoch dahin, dass der Niederschlag abfiltrirt und nur das Filtrat benutzt werden soll.

Bei dieser Sachlage ist durchaus nicht abzusehen, wie sich Neubauer davon überzeugt hat, dass sein Verfahren «mit absoluter Sicherheit» arbeitet. Ein Beweis dafür ist nirgends zu finden. Auch die Befunde Fürbringer's, der unter 49 Fällen 40 Mal Oxalsäure fand, 9 Mal nicht¹⁾, sprechen nicht für die Sicherheit der Methode. Entschieden dagegen sprechen die grossen Schwankungen der Quantität an den einzelnen Tagen von längeren Versuchsreihen, die sich zahlreich in der Litteratur finden. Es ist in hohem Grade wahrscheinlich, dass in den Fällen, in welchen keine Oxalsäure gefunden wurde, dieses nur Schuld der Methode ist, ich habe sie wenigstens in früheren Versuchen in keinem Harn vermisst, den ich nach dem oben angeführten Verfahren mit Chlorcalcium und Kalkmilch untersucht habe. Ich habe ferner regelmässig in solchen Harnen, in denen die Neubauer'sche Methode, auch nach mehrtägigem Stehen statt des vorgeschriebenen 24stündigen, ein negatives Resultat ergeben hatte, doch Oxalsäure nach dem unten anzugebenden Verfahren gefunden bzw. in Harnen, in die Neubauer'sche Methode nur eine minimale Ausscheidung von oxalsaurem Kalk ergeben hatte, in dem Filtrat noch relativ viel Oxalsäure gefunden. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass die Neubauer'sche Methode unsicher ist. Ausserdem gehört sie bezüglich der Ausführung zu den allerunangenehmsten; es dauert oft tagelang, ehe die Filtration von 500 ccm. epithelienhaltigen Harns durch ein kleines Filter beendet ist, ja manchmal stockt die Filtration vollständig, sodass man genöthigt ist, noch ein zweites Filter zu nehmen.

Nach der quantitativen Seite hält übrigens auch Huppert die Methode durchaus nicht für genügend. Er sagt (Harnanalyse 10. Aufl. S. 788):

«Eine befriedigende Methode zur Bestimmung der Oxalsäure ist nicht bekannt. Man hat sich bisher der von Neubauer angegebenen bedient, nach welcher die Oxalsäure mit Phosphorsäure zusammen als Kalksalze gefällt und diese beiden durch Essigsäure getrennt werden. Das Calciumoxalat

1) Maly's Jahresber. für Thierchem. f. 1876 S. 145.

ist aber sowohl in der Essigsäure, als auch in dem entstehenden zweifach sauren Phosphat nicht unlöslich, und wenn diese Löslichkeit absolut auch nicht gross ist, so fällt sie bei den geringen Mengen Oxalsäure, welche im Harn vorkommen, sehr ins Gewicht.»

Das ist auch durchaus meine Meinung, die sich auf die sorgfältigen unter meiner Leitung ausgeführten Untersuchungen von O. Nickel¹⁾ stützt, der die Neubauer'sche und Schultzen'sche Methode kritisch untersucht und auch über die Löslichkeit des oxalsauren und phosphorsauren Kalks in Essigsäure Versuche angestellt hat, aus welchen die Unmöglichkeit einer glatten Trennung von phosphorsaurem und oxalsaurem Kalk mit Essigsäure hervorgeht. Dieser Uebelstand zeigt sich auch bei der an Stelle der Neubauer'schen mitunter angewendeten Schultzen'schen Methode, welche indessen immerhin den Vorzug grösserer Sicherheit vor der Neubauer'schen voraus hat. Im Uebrigen kann ich bezüglich der Schultzen'schen Methode wohl auf die erwähnte Arbeit von O. Nickel verweisen.

Eine Erwähnung verdient noch der Vorschlag von Löbisch,²⁾ den beim Schultzen'schen Verfahren erhaltenen Niederschlag nicht zu glühen und zu wägen, da er häufig durch Calciumsulfat verunreinigt ist, sondern mit Kaliumpermanganat zu titriren, es ist indessen dagegen zu bemerken, dass der oxalsäure Kalk durchaus nicht immer frei von organischer Substanz zu erhalten ist, die natürlich auch auf das Kaliumpermanganat einwirkt.

Die bisherigen Methoden zur Bestimmung der Oxalsäure sind also unsicher, mit einer unsichern Methode kann man aber keine sicheren Resultate erhalten, sondern nur solche, die unter bestimmten Verhältnissen einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit beanspruchen können.

Es galt also ein Verfahren zu finden, bei welchem die störende Phosphorsäure von vornherein eliminirt ist. Ein

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XI, S. 186.

2) Löbisch, Harnanalyse 3. Aufl. S. 126.

solches Verfahren fand ich nun in der Ausschüttelung des eingedampften und mit Salzsäure angesäuerten Harns mit alkoholhaltigem Aether, welcher die Oxalsäure vollständig, von der Phosphorsäure aber nur Spuren aufnimmt.¹⁾ Es ist sehr auffallend, dass Niemand bisher an dieses Hilfsmittel gedacht zu haben scheint, umsomehr, als ich es schon vor langer Zeit zum Nachweis von Oxalsäure im Blute von mit Phenol vergifteten Kaninchen angewendet habe.²⁾ Vielleicht liegt der Grund darin, dass die Oxalsäure im Allgemeinen als in Aether unlöslich gilt. Sie ist auch in der That schwer löslich, aber in ausreichendem Grade löslich bei den kleinen in Harn vorkommenden Mengen, ganz besonders dann, wenn man dem Aether eine gewisse Quantität Alkohol zusetzt, was ohnehin meistens erforderlich ist, um eine gute Trennung des ätherischen Auszuges von der wässerigen Flüssigkeit herbeizuführen. Uebrigens ist nach den Versuchen von R. Gottlieb³⁾ die Löslichkeit der Oxalsäure in Aether weit grösser, als man früher annahm: 100 ccm. Aether lösten nach ihm in 2 Versuchen 1,642 bzw. 1,583 g Oxalsäure.

Die quantitative Bestimmung der Oxalsäure gestaltet sich sehr einfach.

Handelt es sich um menschlichen Harn mittlerer Concentration, so dampft man 500 ccm nicht filtrirten Harns auf etwa $\frac{1}{3}$ ein, lässt erkalten, säuert mit 20 ccm Salzsäure von 1,12 D an und schüttelt 3 Mal mit je 200 ccm. eines Gemisches von 9 bis 10 Vol. Aether und 1 Vol. Alkohol. Die Aetherauszüge werden sorgfältig abgetrennt, dann noch durch ein nicht angefeuchtetes Filter filtrirt und abdestillirt. Die zurückbleibende alkoholische, noch etwas Aether enthaltende Flüssig-

1) Eine kurze Angabe über dieses Verfahren habe ich schon im Centralbl. f. d. m. W. 1899 Nr. 16 gemacht.

2) Pflüger's Archiv Bd. 5 S. 357.

3) Arch. f. exp. Path. Bd. 42 S. 242. Ich möchte noch bemerken, dass meine oben citirte Publication in dem Cbl. f. d. m. W. etwas vor die citirte von Gottlieb fällt, ich also nicht etwa erst durch die Angaben von Gottlieb auf den Gedanken gekommen bin, von der Löslichkeit der Oxalsäure in Aether zur quantitativen Bestimmung Gebrauch zu machen.

keit wird in eine hochwandige Schale gegossen und unter Zusatz von etwa 10—15 ccm. Wasser auf dem Wasserbad eingedampft, die entstehende milchige Flüssigkeit weiter eingedampft, nöthigenfalls unter Wasserzusatz, bis sie sich klärt und sich harzige Massen ausscheiden. Dieses Verfahren ist besser, als wenn man den Alkohol und Aether für sich völlig vertreibt und den Rückstand mit Wasser extrahirt; man ist dabei sicherer, dass die Oxalsäure völlig in Lösung geht, und ist ausserdem vor der Möglichkeit der Bildung von Oxalester geschützt. Man lässt nun erkalten, wobei völlige Klärung der Flüssigkeit eintritt — das Volumen der Flüssigkeit sei etwa 20 ccm., event. ist etwas Wasser zuzusetzen —, filtrirt durch ein kleines Filterchen, wäscht 1—2 Mal mit möglichst wenig Wasser nach. Das Filtrat wird mit Ammoniak leicht alkalisirt, 1—2 ccm. einer 10 %igen Chlorcalciumlösung, dann Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaction hinzugefügt. Die Reaction soll sauer sein, aber nicht zu stark sauer. Einen Anhaltspunkt gewährt die Beschaffenheit der Flüssigkeit nach dem Essigsäurezusatz. Da sie doch stets etwas Phosphorsäure enthält, so entsteht beim Zusatz von Chlorcalcium eine flockige Ausscheidung von Calciumphosphat; man muss soviel Essigsäure hinzusetzen, dass sich dieses löst. In manchen Fällen — namentlich bei der Untersuchung von Organauszügen — kann es zweckmässig sein, zuerst Essigsäure hinzuzusetzen und dann Chlorcalcium. Es bilden sich nämlich mitunter nach dem Essigsäurezusatz Trübungen, namentlich von Fettsäuren, von welchen man, wenn noch kein Chlorcalcium zugesetzt wurde, abfiltriren kann. Dabei begiebt man sich allerdings des Vortheils, dass man in dem Aussehen der Flüssigkeit einen Anhalt für die Bemessung der Quantität der Essigsäure hat. Nach mindestens 24 Stunden wird der oxalsaure Kalk in der gewöhnlichen Weise auf einem aschefreien Filter gesammelt, ausgewaschen, getrocknet, geglüht, der zurückbleibende Aetzkalk gewogen. Ich bemerke noch, dass der Niederschlag bei grösserem Oxalsäuregehalt — namentlich bei Hundeharn — sofort entsteht und dann, mikroskopisch untersucht, zwar ganz homogen, aber unkrystallinisch erscheint,

bei geringem Gehalt sich langsam ausscheidet und sich dann durchweg krystallinisch erweist, und zwar bildet er entweder Octaëder oder die von Feser und Friedberger¹⁾ beschriebenen Formen (quadratische Prismen mit pyramidalen Endflächen).

Sehr concentrirten Hundeharn braucht man gar nicht einzudampfen, man kann vielmehr 200 ccm. nach dem Ansäuern mit 20 ccm. Salzsäure direkt ausschütteln, vom Hundeharn mittlerer Concentration nimmt man etwa 300 ccm. und dampft auf die Hälfte ein.

Es liegt mir nun ob, den Beweis zu liefern, dass dieses Verfahren in der That richtige Werthe ergibt.

1. Die Reinheit des gefällten oxalsauren Kalks wird bewiesen durch die mikroskopische Untersuchung, welche bei langsamer Ausscheidung neben den Krystallen nichts Anderes aufweist, und durch die chemische Untersuchung des geglühten Aetzkalks. Nach dem Verfahren ist allenfalls eine Verunreinigung mit Phosphorsäure denkbar. Der Aetzkalk erweist sich aber entweder ganz oder bis auf eine minimale Molybdänsäure-Reaction frei von Phosphorsäure. Ein fehlerhaftes Plus bei dem Verfahren ist also ausgeschlossen.

2. Es handelt sich nun noch um den Nachweis, dass die Oxalsäure durch das Extractionsmittel vollständig ausgezogen wird. Zu dem Zweck habe ich wiederholt den drei Mal mit Aether ausgeschüttelten Harn noch zum vierten Male ausgeschüttelt; in diesem Auszug war niemals Oxalsäure nachweisbar. Ich bemerke indessen, dass dieses nur für den Harn gilt. Untersucht man auf demselben Wege oxalsäurereiche Vegetabilien (salzsaure Auszüge), so kann man sich nicht unbedingt darauf verlassen, dass die drei Aetherauszüge schon alle Oxalsäure enthalten, ich will auch nicht behaupten, dass für diesen Fall das Verfahren der Aetherextraction besonders zweckmässig sei. Uebrigens steht nichts im Wege, bei solchen Harnen, bei welchen man Grund hat, einen grösseren Gehalt an Oxalsäure zu vermuthen, noch eine vierte oder fünfte Aether-

¹⁾ Maly's Jahresber. Bd. 4 S. 231.

extraction anzuwenden, für erforderlich halte ich es nach meinen bisherigen Erfahrungen nicht.

Man konnte nun ferner daran denken, dass die harzigen Massen, welche bei der Extraction des Aetherverdampfungsrückstandes mit Wasser zurückbleiben, vielleicht noch Oxalsäure einschliessen. Um dieses zu prüfen, habe ich einerseits die rückständige Masse noch einmal mit Wasser ausgekocht, nach dem Erkalten filtrirt, das Filtrat eingedampft: in diesem Filtrat war nie Oxalsäure nachweisbar —, anderseits habe ich die harzige Masse direkt in Ammoniak gelöst, Chlorcalcium hinzugesetzt und mit Essigsäure angesäuert: dabei wird stets eine stark trübe Flüssigkeit erhalten, aus der sich beim Stehen eine harzige, ziemlich harte Masse ausscheidet. Dieselbe ist stets ganz unkrystallinisch, zum grössten Theil löslich in Alkohol und Aether und hinterlässt beim Glühen 0,3 bis 0,4 mg zum Theil aus Aetzkalk bestehenden Rückstand. Natürlich braucht dieser Aetzkalk nicht aus oxalsaurem Kalk abzustammen, er kann auch aus einer Kalkverbindung des Harzes herrühren, jedenfalls aber ist die Quantität minimal. Also auch bei der Extraction mit Wasser ist man sicher, die Oxalsäure vollständig zu erhalten. Eine weitere Quelle des Verlustes von Oxalsäure ist aber nicht ersichtlich.

Unter diesen Umständen habe ich eine grössere Reihe von zeitraubenden Doppeluntersuchungen für entbehrlich gehalten und mich auf einige beschränkt.

1. 500 ccm. eines menschlichen Harns von 1018 spec. Gewicht gaben a) 4,0 mg und b) 4,2 mg Aetzkalk, bei Annahme einer Tagesquantität von 1500 ccm., also im Mittel 12,3 mg Ca = 20,5 mg Oxalsäure (wasserfreie Oxalsäure = 90, Aetzkalk = 56 gerechnet).

2. 750 ccm. desselben Harns ergaben 6,1 mg.

3. 500 ccm. eines anderen Harns a) 4,5 mg, b) 4,3 mg CaO = 22 mg Oxalsäure p. d.

4. 300 ccm. eines Hundeharns gab in 3 Bestimmungen a) 5,4 mg, b) 4,8 mg, c) 5,4 mg Aetzkalk.

5. 300 ccm. eines anderen Hundeharns gaben a) 6,2 mg, b) 7,8 mg Aetzkalk.

Die Uebereinstimmung ist beim Hundeharn keine ganz so gute wie beim Menschenharn. Es sind übrigens im Labora-

torium bei Arbeiten über die Oxalsäure im Menschenharn noch weitere Doppelbestimmungen ausgeführt worden, welche bei entsprechender Gelegenheit angeführt werden sollen.

Es fragt sich noch, ob das Verfahren irgend welche Schwierigkeiten bietet; solche können mitunter dadurch entstehen, dass sich der Aether schlecht absetzt. Man lässt dann den Harn ab, soweit er klar ist, giesst auch die Aetherschicht ab, soweit sie sich geklärt hat, und behandelt die Zwischenschicht mit einer neuen Portion Aether. Ferner gelingt mitunter die Abscheidung der harzigen Substanz nicht ganz gut (dieses ist mir übrigens nur am Anfang vorgekommen, in letzter Zeit nicht); es wird dann die ganze Flüssigkeit, aus welcher sich der oxalsäure Kalk abscheidet, harzig trüb und mit dem oxalsauren Kalk scheidet sich auch etwas Harz aus. Dieses Verhalten ist ohne Bedeutung, da das Harz beim Waschen des Filters mit Alkohol und Aether grösstentheils in Lösung geht und beim Verbrennen keinen oder nur einen minimalen Rückstand gibt. Man kann übrigens auch, wenn diese Erscheinung eintreten sollte, die trübe Flüssigkeit wiederholt mit Aether durchrühren und den Aether oben abgiessen. Dies ist ohne Verlust an oxalsaurem Kalk ausführbar.

Der Nachweis der Oxalsäure in den Geweben ist gleichfalls auf dem Wege der Aetherextraction sehr leicht zu führen. Man wird gut thun, stets grössere Mengen der betreffenden Organe oder Gewebe — nicht unter 250—500 g — in Arbeit zu nehmen, da die Oxalsäure stets nur in eben wägbarer Menge oder in Spuren vorhanden ist.

Das feingehackte Gewebe wird mit dem mehrfachen Volumen Wasser digerirt, dann direkt zum Sieden erhitzt, colirt, abgepresst, nachgewaschen, eingedampft, event. noch einmal filtrirt und der stark eingeeengte Auszug nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Aether ausgeschüttelt. Kleine Störungen können durch die Gegenwart von Seifen in den Auszügen verursacht werden. Es entstehen bei der Ausfällung mit Chlorcalcium und Essigsäure häufig Trübungen, die von der Gegenwart von Fettsäuren abhängen. Die mikroskopische Untersuchung schützt

vor Verwechslungen; für die quantitative Bestimmung kommen diese Ausscheidungen nicht in Betracht.

Man könnte denken, dass in den Rückständen noch oxalsaurer Kalk stecken kann, das scheint indessen nicht der Fall zu sein. Wiederholt habe ich diese Rückstände mit verdünnter Salzsäure extrahiert und den Auszug auf Oxalsäure untersucht, stets vergeblich.

Ausgedehntere Untersuchungen über den Oxalsäuregehalt der Organe stehen noch aus, ich will hier nur erwähnen, dass ich in der Leber stets Oxalsäure gefunden habe — auf 1 Kilo Leber berechnet in Kalbsleber 10,66 und 8,73 mg, in Rinderleber 12 mg — weniger in den Muskeln, nichts im Pankreas.

Ich knüpfe hieran noch einige Bemerkungen über die Oxalursäure. Die Oxalursäure ist bekanntlich von Schunk, wenn auch nur in minimalen Mengen, in normalem Harn gefunden worden, ebenso in Nachuntersuchungen von Neubauer. Huppert macht in seinem Handbuch der Harnanalyse 10. Aufl. S. 400 die Bemerkung, dass die Oxalursäure bei der Art des Nachweises sich recht wohl erst bei der Harnfäulnis gebildet haben könne. Er verweist dabei auf S. 321 seines Buches, auf der allerdings an der citirten Stelle nur angegeben ist, dass die Harnsäure unter der Einwirkung von Mikroorganismen zersetzt wird. Die Abscheidung der Oxalursäure als Ammonsalz beruht auf der langsamen Filtration grosser Mengen Harn durch Kohle, welche das oxalursäure Ammon aufnimmt. Dabei ist natürlich Harnfäulnis nicht ausgeschlossen, darin muss man Huppert durchaus beistimmen, und dass bei der Zersetzung der Harnsäure Oxalursäure entsteht, liegt gewiss im Bereich der Möglichkeit. Der Nachweis, dass Oxalursäure im Harn präformirt vorkommt, ist also mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die Entscheidung der Frage, ob der Harn in der That Oxalursäure präformirt enthält, wäre ohne Zweifel von einem nicht unerheblichen theoretischen Interesse. Enthält der Harn Oxalursäure, so deutet dieses darauf hin, dass die Oxalsäure aus der Oxalursäure hervorgeht. Da die Oxalursäure aber kaum eine andere Quelle haben kann, als die Oxydation

der Harnsäure, so wäre damit die schon oft behauptete Abstammung der Oxalsäure von der Harnsäure höchst wahrscheinlich gemacht. Leider sind die Aussichten, diesen Nachweis unter Beibehaltung des Kohleverfahrens zu führen, sehr gering. Denn wenn man auch die Harnfäulniss vielleicht durch Anwendung geeigneter Antiseptica ausschliessen könnte, bleibt immer noch der Einwand, dass die Oxalursäure durch Oxydation der Harnsäure während des Versuchs entstanden sein könnte.

Mit Kontrollversuchen über das oben beschriebene Verfahren zur Bestimmung der Oxalsäure des Harns beschäftigt, machte ich nun eine Beobachtung, welche dafür zu sprechen schien, dass die Oxalursäure im Harn präformirt ist und nicht erst nachträglich, sei es durch Mikroorganismen, sei es durch einfache Oxydation, aus der Harnsäure entsteht.

Aus 750 ccm. eines Harns erhielt ich in einem Versuch 6,1 mg Aetzkalk, entsprechend 10,1 mg Oxalsäure.

Andere 750 ccm. wurden, nachdem der Harn auf freiem Feuer etwa auf die Hälfte eingedampft war, mit 20 ccm. Salzsäure versetzt, um das sich bemerkbar machende unangenehme Stossen zu verhüten und zuerst noch etwas auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad eingedampft. Zufällig wurde es versäumt, die Eindampfung rechtzeitig zu unterbrechen, die Verdampfung ging vielmehr bis zur starken Syrupconsistenz. Beim Aufnehmen des Rückstands mit Wasser blieb eine reichliche Quantität eines bräunlichen Schlammes von Huminsubstanzen ungelöst, von welchen abfiltrirt wurde. Die Untersuchung dieses Filtrates ergab weit mehr Oxalsäure, nämlich 10,2 mg Aetzkalk, entsprechend 17 mg Oxalsäure.

Derselbe Versuch wurde mit je 500 ccm. desselben Harns angestellt. Zwei «normal» ausgeführte Bestimmungen ergaben 4,0 mg, 4,2 mg Aetzkalk, als jedoch 500 ccm. schwach eingedampft, dann mit 20 ccm. Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbad möglichst weit eingedampft wurden, betrug die Quantität des erhaltenen Aetzkalks 9,7 mg.

Es stand also fest, dass aus dem betreffenden Harn etwa die doppelte Quantität Oxalsäure resultirte, wenn er vorher mit Säure erhitzt war. Diese abgespaltene Oxalsäure kann kaum einen anderen Ursprung, als aus im Harn vorhandener Oxalursäure haben, deren Quantität danach, relativ genommen, sehr erheblich sein müsste.

Es fragte sich nun, ob man diese Beobachtungen verallgemeinern dürfe. Bei näherer Ueberlegung erschien dieses nicht ohne Weiteres zulässig. Der betreffende Harn war in einer Quantität von 4—4 $\frac{1}{2}$ Liter längere Zeit unter Chloroformzusatz aufbewahrt worden, es scheint nicht ausgeschlossen, dass dabei Harnsäure oxydirt und Oxalursäure gebildet wird, umsomehr, als ich schon wiederholt beobachtet habe, dass längere Zeit mit Chloroform aufbewahrte Harne bei der quantitativen Bestimmung auffallend wenig Harnsäure ergaben, wenn die Abnahme auch nicht durch Doppelbestimmungen in frischem und conservirtem Zustand festgestellt ist. Der Versuch war also an frischem Harn zu wiederholen.

Es diente dazu zunächst ein Hundeharn. Von demselben kamen 300 ccm. zur Anwendung; dieselben wurden etwa auf die Hälfte eingedampft, mit 20 ccm. Salzsäure versetzt, 3 Mal mit alkoholhaltigem Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug auf Oxalsäure verarbeitet. Der ausgeätherte Harn, der mit B bezeichnet werden mag, blieb dann zunächst in einer Abdampfschaale bis zum nächsten Tage stehen, der Rest des Aethers wurde auf dem Wasserbad entfernt, dann die Flüssigkeit reichlich 2 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Einwirkung der Salzsäure war dabei anscheinend keine so energische, wie beim Eindampfen auf dem Wasserbad, wenigstens war die Bildung von Huminsubstanzen weit geringer. Der mit Salzsäure gekochte Harn wurde nun gleichfalls auf Oxalsäure untersucht. Der Versuch wurde an demselben Harn 3 Mal in derselben Weise ausgeführt. In jedem Fall fand sich auch zum zweiten Mal am nächsten Tage eine durchweg (mikroskopisch) krystallinische Ausscheidung von oxalsaurem Kalk. Der ganze Versuch wurde quantitativ durchgeführt. Die erhaltene Menge Aetzkalk betrug in Milligramm:

	A aus präformirter Oxalsäure	B aus abgespaltener Oxalsäure	C zusammen
Versuch I	5,4	2,0	7,4
• II	4,8	2,4	7,2
• III	5,4	1,5	6,9

Derselbe Versuch wurde noch an einem anderen Hundeharn angestellt, jedoch in diesem Falle nicht am Rückflusskühler gekocht, sondern, wie bei der ersten Beobachtung, auf dem Wasserbad eingedampft. Der erhaltene Aetzkalk betrug in Milligramm:

	A aus präformirter Oxalsäure	B aus abgespaltener Oxalsäure	C zusammen
Versuch I	6,2	2,8	9,0
• II	7,8	2,2	10,0

Auch hier wurde durch die mikroskopische Untersuchung festgestellt, dass der erhaltene Niederschlag stets durchweg krystallinisch war.

Die Abspaltung von Oxalsäure war also auch an dem frischen Hundeharn zu constatiren, jedoch war sie weit geringer, wie in dem conservirten menschlichen Harn. Ferner ist bemerkenswerth, dass die Summen von präformirter und abgespaltener Oxalsäure besser übereinstimmen, als die Zahlen für die präformirte Oxalsäure; man erhält darnach den Eindruck, als ob ein Minus an präformirter Oxalsäure durch ein Plus von abgespaltener ausgeglichen wird. Diese Erscheinung könnte sich dadurch erklären, dass während der Verarbeitung der salzsäurehaltigen Mischung schon eine gewisse Zersetzung

von im eingedampften Harn vorhandener Oxalsäure Platz greifen kann, wenn wir den Oxalsäure liefernden Körper vorläufig so bezeichnen wollen. Diese Zersetzung wird natürlich nicht ganz gleichmässig sein, da die Verarbeitung nicht immer genau dieselbe Zeit dauerte. Notizen hierüber habe ich leider nicht gemacht. Selbstverständlich liegt in dieser Möglichkeit eine gewisse Gefahr für die Richtigkeit der Oxalsäurebestimmung und es folgt daraus jedenfalls, dass man die Aetherausschüttelungen schnell hintereinander machen muss und nicht stundenlang stehen lassen darf.

Der Versuch musste nunmehr noch an menschlichem Harn angestellt werden, da die Versuche mit conservirtem Harn augenscheinlich nicht ganz beweisend sind. Gleichzeitig sollte bei diesem Versuch festgestellt werden, welches Verfahren mehr Oxalsäure liefert, die Verdampfung mit Salzsäure auf dem Wasserbade oder das Kochen am Rückflusskühler. Es wurden also 2 Portionen desselben Harns genommen zu 500 ccm., beide wurden eingedampft und wie gewöhnlich auf Oxalsäure untersucht = Ia und IIa.

Der ausgeätherte Harn I wurde am Rückflusskühler gekocht, wieder ausgeäthert: Ib, der bleibende Harn auf dem Wasserbad eingedampft und wieder ausgeäthert: Ic.

Der Harn II wurde in umgekehrter Reihenfolge bearbeitet. Zuerst wie gewöhnlich bearbeitet: IIa, dann auf dem Wasserbad eingedampft und ausgeäthert: IIb, dann am Rückflusskühler gekocht und ausgeäthert: IIc. Auch dieses Mal wurde beobachtet, dass die Ausscheidung von Huminsubstanz beim Eindampfen auf dem Wasserbad weit stärker war, wie beim Kochen am Rückflusskühler.

Es wurde Aetzkalk erhalten in Milligramm:

I		
a) 4,5	b) 2,1	c) 0,4 (?)
II		
a) 4,3	b) 2,2	c) Spur ?

Danach würde es ganz gleich sein, ob man den Harn auf dem Wasserbad mit Salzsäure eindampft oder am Rückflusskühler kocht, das erstere Verfahren, als das bequemere, natürlich vorzuziehen sein.

Es lag nahe, zu versuchen, ob bei der durch Thymusfütterung bewirkten Steigerung der Harnsäure- und Oxalsäureausscheidung nicht auch die abspaltbare Oxalsäure zunehme. Zu dem Zweck ersetzte die Versuchsperson — ein gesunder kräftiger Mann — an einem Tage das Eiweiss der gewohnten Nahrung zum grössten Theil durch ca. 500 g Thymus.

Der Harn wurde am Tage der Thymusaufnahme, sowie einen Tag vorher und nachher gesammelt. Derselbe war am ersten und zweiten Tage klar, am dritten hatte sich Harnsäure ausgeschieden, welche fest an den Wänden der zur Aufsammlung des Harns benutzten Flasche haftete. Diese Harnsäure wurde nach dem Abgiessen des Harns in Piperazinlösung gelöst, durch Salzsäure ausgefällt, filtrirt, ausgewaschen, getrocknet, gewogen, das Gewicht zu der in gelöster Form ausgeschiedenen Harnsäure hinzuaddirt. Die Oxalsäure (a) wurde in 500 ccm. bestimmt, die abspaltbare Oxalsäure (b) durch Eindampfen des ausgeätherten Harns mit Salzsäure u. s. w., die Harnsäure nach dem Silberverfahren.

Die Ausscheidung von Gesamt-N, Harnsäure, Oxalsäure und abspaltbarer Oxalsäure gestaltete sich folgendermassen:

	Harn- menge	N	Harn- säure	Oxalsäure		
				a	b	a+b
Tag vor der Thymuszufuhr	1960	15,70	0,770	26,45	9,14	35,59
Tag der Thymuszufuhr	1760	16,34	1,468	28,24	11,11	39,35
Tag nach der Thymuszufuhr	1540	15,09	1,086	20,90	9,75	30,65

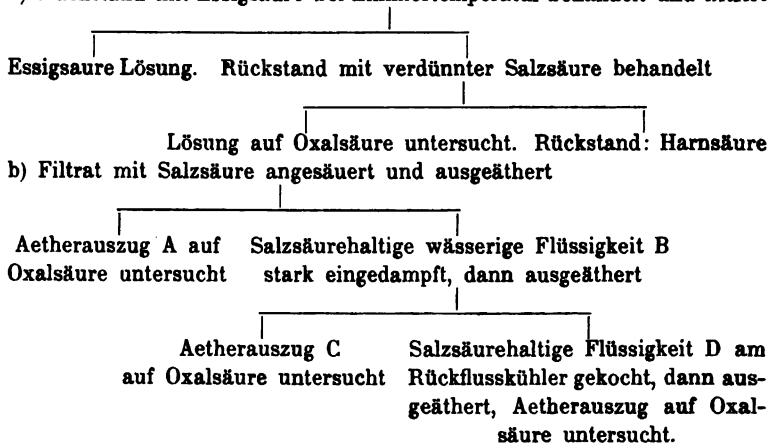
Wenn man will, kann man am dritten Tage, der offenbar noch unter dem Einfluss der Thymusfütterung steht, eine gewisse Tendenz zur Vermehrung der abspaltbaren Oxalsäure gegenüber der als solche ausgeschiedenen sehen, bestimmte Schlussfolgerungen sind aber natürlich aus so minimalen Differenzen nicht zu ziehen. Augenscheinlich liegen die Verhältnisse in dem Versuch für die Erlangung beweiskräftigen Resultat insofern sehr ungünstig, als die Oxalsäureausscheidung schon am Tage vor der Thymuszufuhr recht hoch war. Es würde

nöthig sein, Versuche an Personen mit geringer individueller Oxalsäureausscheidung anzustellen, wozu mir die Gelegenheit mangelte.

Die ganze Frage nach dem Vorkommen der Oxalursäure im Harn bezw. der Bedeutung der durch Salzsäure abspaltbaren Oxalsäure erscheint nun aber nach weiteren zur Aufklärung der Sachlage angestellten Versuchen, die zu unerwarteten Ergebnissen führten, in einem andern Lichte.

4 Liter frischen menschlichen Harns mittlerer Concentration wurden auf dem Wasserbad stark eingedampft, sodass die Salze grösstentheils auskrystallisirten. Aus äusseren Gründen war die betreffende Abdampfschale einige Wochen bedeckt stehen geblieben. Der halb syropöse halb krystallinische Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und filtrirt. Das Filtrat (ca. 400 ccm.) und der ausgewaschene Rückstand wurden nach folgendem Schema bearbeitet.

a) Rückstand mit Essigsäure bei Zimmertemperatur behandelt und filtrirt



Hierzu sei noch Folgendes bemerkt:

a) Unlöslicher Rückstand.

Im unlöslichen Rückstand konnte möglicher Weise oxalursaurer Kalk vorhanden sein. Zur Untersuchung hierauf wurde er mit ca. 250 ccm. Essigsäure von 25% bei Zimmertemperatur extrahirt, die Lösung filtrirt und zum Sieden erhitzt; es schied sich nur ein ganz minimaler, unwägbarer Bodensatz

ab, der nach der mikroskopischen Untersuchung wahrscheinlich schwefelsaurer Kalk, jedenfalls nicht oxalsaurer Kalk war. Der nunmehr gebliebene Rückstand wurde mit verdünnter Salzsäure in der Wärme behandelt und filtrirt, das Filtrat ausgeäthert. Der Aetherauszug lieferte 5 mg. CaO aus oxalsaurem Kalk.

b) Filtrat.

1. Der Aetherauszug A enthält äusserst wenig Oxalsäure; es wurden im Ganzen nur 1,8 mg. CaO aus oxalsaurem Kalk herrührend erhalten. Da die betreffende Lösung, aus welcher die Ausfällung des oxalsuren Kalks erfolgt war, augenscheinlich noch ziemlich stark durch Harnbestandtheile verunreinigt war (es war nöthig gewesen, zur Abtrennung des Aetheraus-zuges noch Alkohol anzuwenden) und die Möglichkeit vorlag, dass diese Harnbestandtheile oxalsuren Kalk in Lösung halten könnten, so wurde das Filtrat von oxalsaurem Kalk nochmals mit Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Der Aetherauszug enthielt jedoch keine Oxalsäure, die betreffende Flüssigkeit blieb auf Zusatz von Chlorcalium ganz klar.

2. Der Aetherauszug C lieferte 13 mg CaO aus oxalsaurem Kalk = 21 mg Oxalsäure. Die wässerige salzsäurehaltige Flüssigkeit wurde mit noch mehr Salzsäure versetzt und ca. 3 Stunden am Rückflusskühler gekocht, dann mit Aether ausgeschüttelt: im Aetherauszug war keine Spur von Oxalsäure nachweisbar. Da die Quantität der aus 4 Liter Harn erhaltenen Oxalsäure sehr gering war, so war dieser Befund auffallend. Er fand seine Erklärung sehr bald dahin, dass die Flüssigkeit in Folge der Zersetzung von Harnstoff durch die Salzsäure schwach alkalische Reaction angenommen hatte. Es wurde daher nochmals Salzsäure zugesetzt und im Wasserbad eingedampft, verdünnt und wiederum mit Aether ausgeschüttelt. Der Aetherauszug lieferte 9,6 mg CaO aus oxalsaurem Kalk = 16 mg Oxalsäure.

Im Ganzen wurden also aus der von der Oxalsäure befreiten Flüssigkeit durch Erhitzen mit Salzsäure noch $21,7 + 16 = 37,7$ mg Oxalsäure erhalten.

Der im Vorstehenden mitgetheilte Befund ist nach verschiedenen Richtungen bemerkenswerth: 1. ist durch das Eindampfen des Harns eine Lösung erhalten worden, welche fast gar keine Oxalsäure als solche erhielt, sondern nur gebundene, durch Erhitzen mit Salzsäure abspaltbare; 2. ist die Gesamtsumme der erhaltenen Oxalsäure sehr gering. Es wurden erhalten:

a) Aus dem Rückstand . . . 5,0 mg CaO.

b) Aus dem Filtrat:

a) direkt 1,8 „ „

b) nach dem Erhitzen

mit Salzsäure . . 22,6 „ „

29.4 mg CaO = 49 mg Oxalsäure.

Da es sich um ziemlich concentrirten Harn von derselben Provenienz wie der früher untersuchte handelte, so wären gegenüber den gefundenen 49 mg Oxalsäure etwa 70 mg zu erwarten gewesen.

Die Ursache des Deficits konnte in zwei Umständen liegen: 1. lag die Möglichkeit vor, dass die essigsäure Lösung des «Rückstandes» noch oxalsauren Kalk enthielt, bei der relativ grossen Menge der angewendeten Essigsäure war dieses nicht undenkbar; 2. ist die Ausschüttelung mit Aether nicht so lange fortgesetzt worden, bis der Aether sicher keine Oxalsäure mehr aufnahm; es war also möglich, wenn auch schwer denkbar, dass die Oxalsäure nicht vollständig abgespalten oder aus der Flüssigkeit nicht vollständig extrahirt war. Diese beiden Umstände gaben die Veranlassung, den Versuch noch einmal mit 4 Liter menschlichen Harns zu wiederholen, jedoch mit der Modification, dass der «Rückstand» nicht mit Essigsäure, sondern mit Salzsäure behandelt und die salzsaure Lösung auf Oxalsäure untersucht wurde, dass ferner die Aetherausschüttelungen der Flüssigkeit weiter fortgesetzt wurden.

Aus der salzsauren Lösung des Rückstandes wurden durch Ausschütteln mit Aether 7,0 mg CaO aus oxalsaurem Kalk erhalten, aus dem wässerigen Filtrat nach Ansäuern mit Salzsäure 6,8 mg CaO, im Ganzen wurden also aus präformirter Oxalsäure erhalten 13,8 mg CaO = 23,0 mg Oxalsäure. Die

ausgeätherte Lösung wurde mit ca. 50 ccm. Salzsäure versetzt und drei Stunden am Rückflusskühler gekocht: sie war alkalisch geworden.¹⁾ Durch Ansäuern und Ausschütteln mit Aether wurden 9,2 mg CaO aus Oxalsäure erhalten (1).

Die rückständige salzsaure Flüssigkeit wurde nunmehr unter erneutem Salzsäurezusatz auf dem Wasserbade stark eingedampft, wobei die Reaction bis zum Schluss stark sauer blieb. Die Lösung wurde wieder ausgeäthert.²⁾ Der Aetherauszug lieferte 0,0166 CaO aus oxalsaurem Kalk (2). Die wässerige Flüssigkeit wurde wieder stark eingedampft, dann auf 400 ccm. gebracht und ausgeäthert: der Aetherauszug lieferte 0,0044 CaO aus Oxalsäure (3). Die wässerige Flüssigkeit von (3) wurde wieder eingedampft, verdünnt und ausgeäthert. Der Aetherauszug lieferte 0,0056 CaO aus Oxalsäure (4).

Der fortdauernde Gehalt an Oxalsäure erregte den Verdacht, dass die Oxalsäure in den späteren Operationen vielleicht gar nicht neugebildet, sondern von vornherein vorhanden, jedoch nur sehr schwierig vom Aether aufgenommen werde. Die wässerige Flüssigkeit von (4) wurde daher nicht eingedampft, sondern direkt aufs Neue ausgeäthert (wie immer drei Mal). In der That entstand in der betreffenden Lösung durch CaCl_2 ein Niederschlag, der zum Theil aus wohl ausgebildeten Octaëdern bestand, zum Theil amorph war. Durch Abfiltriren

¹⁾ Es scheint, dass alkalische Reaction um so leichter eintritt, je stärker man mit Salzsäure ansäuert. Diese auf den ersten Blick paradoxe Erscheinung erklärt sich dadurch, dass der Harnstoff in um so grösserem Umfang zersetzt wird, je saurer die Flüssigkeit ist. Da in den 4 Liter Harn ca. 80 g Harnstoff anzunehmen sind, würde man gegen 370 g Salzsäure von 1,12 D brauchen, um sicher zu sein, dass die Reaction schliesslich sauer ist. Bei gleicher Acidität wirkt die Salzsäure am Rückflusskühler augenscheinlich stärker auf den Harnstoff ein, als beim Eindampfen auf dem Wasserbad.

²⁾ In allen diesen Versuchen (auch in dem ersten) beträgt das Volumen der Lösung ca. 400 ccm., und es wurde stets mit 3 Portionen Aetheralkoholmischung, bestehend aus 400 ccm. Aether und 40 ccm. Alkohol, also im Ganzen jede einzelne Lösung mit 1,2 Liter Aether ausgeschüttelt.

des Niederschlages und Glühen wurde 0,0038 CaO erhalten (5). Die Flüssigkeit von (5) wurde wieder ausgeäthert und wiederum ein Niederschlag erhalten, der zum Theil aus Octaedern bestand (6); der beim Glühen erhaltene Rückstand wog 1,4 mg., er war röthlich gefärbt, eisenhaltig, jedoch zum Theil unter stark alkalischer Reaction in Wasser löslich. Die Flüssigkeit von (6) wurde wieder ausgeäthert; auch jetzt waren in dem geringen Bodensatz mikroskopisch noch vereinzelte Octaeder zu finden. Der Glührückstand (7) wog 0,6 mg., war röthlich gefärbt, eisenhaltig, im Wasser nicht löslich, alkalische Reaction nicht zu constatiren. Es ist höchst auffallend, dass nach 21 Ausschüttelungen mit ca. 8,4 Liter Aether immer noch letzte Spuren von Oxalsäure durch die mikroskopische Untersuchung auffindbar waren. Nunmehr wurde die Flüssigkeit als oxalsäurefrei betrachtet: sie wurde aufs Neue mit Salzsäure angesäuert, stark eingedampft, mit Wasser aufgenommen und ausgeäthert. Es entstand ein geringer Niederschlag, jedoch waren in demselben keine Octaeder aufzufinden, der Glührückstand = 0,8 mg. war röthlich, eisenhaltig, in Wasser unlöslich, nicht alkalisch.

Addirt man die in den Operationen 1 bis 6 erhaltenen Quantitäten CaO, so erhält man 41,0 mg CaO = 68,3 mg. Oxalsäure. Zusammen mit den direkt (aus dem «Rückstand» und der wässerigen Lösung) erhaltenen 23 mg. ergeben sich 91,3 mg. für 4 Liter, also für 1 Liter 22,6 mg. Dieser Gehalt stimmt mit den früher am Harn gemachten Beobachtungen überein, es liegt jedenfalls kein Grund zu irgend welchen Bedenken vor. Dagegen ist die Vertheilung der Oxalsäure in direkt erhaltene und erst nach dem Erhitzen mit Salzsäure erhaltene eine ganz andere, wie in den früheren Beobachtungen, bei welchen nur kleine Mengen Harn kurze Zeit eingedampft, d. h. nur bis auf $\frac{1}{3}$ ihres Volumens reducirt wurden. In diesen früheren Beobachtungen war die direkt erhaltene Oxalsäure 2 bis 3 Mal soviel als die abgespaltene, hier ist umgekehrt die letztere an Gewicht ca. 3 Mal so viel, als die letztere, ja im ersten Versuch noch mehr, d. h. bei langdauerndem Eindampfen geht der grössere Theil der Oxalsäure in

eine nicht mehr durch Aether ausziehbare Form über, aus welcher sich aber durch Erhitzen mit Salzsäure Oxalsäure abspalten lässt. Diese Form kann kaum etwas anders sein, als Oxalursäure.

Es fragt sich nun nothwendig: 1. Wie steht es nach diesen Erfahrungen mit der Annahme im Harn präformirter Oxalursäure? 2. Was folgt aus derselben für die quantitative Bestimmung der Oxalsäure?

ad 1. Wenn es feststeht, dass die Oxalsäure des Harns beim Eindampfen unter Umständen in Oxalursäure übergehen kann (der Kürze halber sei die abspaltbare Form damit so bezeichnet), so ist der Nachweis abspaltbarer Oxalsäure im Harn nur dann für einen Gehalt des Harn an präformirter Oxalursäure beweisend, wenn eine Erwärmung des Harns völlig vermieden wird, da es nicht ausgeschlossen ist, dass auch schon bei gelindem Abdampfen Oxalsäure in Oxalursäure übergeht. Die Frage, ob der Harn präformirte Oxalursäure enthält, ist also als eine offene zu betrachten, sie kann nur an direkt untersuchten Harnen und offenbar nur an sehr concentrirten entschieden werden und soll nach dieser Richtung hin weiter bearbeitet werden.

ad 2. Das Eindampfen des Harns ist bei der quantitativen Bestimmung der Oxalsäure aus praktischen Gründen nicht zu entbehren, wenigstens nicht für menschlichen Harn. Man darf das Eindampfen nicht zu lange dauern lassen, darf also nicht zu grosse Quantitäten Harn nehmen, so wünschenswerth es auch wäre, eine etwas grössere Quantität oxalsauren Kalks zur Bestimmung zu erhalten. Aber auch wenn man nur 500 ccm. Harn nimmt, so liegt immer noch die Gefahr eines Deficits durch Uebergang von Oxalsäure in eine nicht durch Aether extrahirbare Form (Oxalursäure) vor. Es fragt sich, ob es unter diesen Umständen nicht besser ist, dem Harn beim Eindampfen saure Reaction zu geben und von vornherein auf die Gewinnung sämmtlicher Oxalsäure, einschliesslich der etwa schon vorhandenen Oxalursäure auszugehen. Dieses Vorgehen würde sich dadurch rechtfertigen, dass physiologisch die Bedeutung der Oxalursäure mit der der Oxalsäure zusammenfällt und, ab-

gesehen von einzelnen besonderen Fällen, ein Bedürfniss zur getrennten Bestimmung beider nicht besteht.

Man wird dann zweckmässig so verfahren, dass man 500 ccm. Harn mit einigen Tropfen Salzsäure ansäuert, zuerst auf freiem Feuer etwa auf ein Drittel des Volumens, dann unter Zusatz von 20 ccm. Salzsäure auf dem Wasserbad stark eindampft, den Rückstand mit Wasser aufnimmt, filtrirt, nachwäscht und das Filtrat mit alkoholhaltigem Aether ausschüttelt. Das Filtriren könnte wohl auch entbehrt werden. Das Volumen der auszuschüttelnden Flüssigkeit wird man zweckmässig auf 150—200 ccm. bemessen, die Reaction derselben muss stark sauer sein, eventuell Salzsäure hinzugesetzt werden.

Weiterhin könnte das Bedenken auftauchen, ob die in den Versuchen mit grossen Mengen stark eingedampften Harns constatirte schwierige Extrahirbarkeit der Oxalsäure durch Aether nicht das beschriebene, auf Ausziehung durch Aether basirte, quantitative Verfahren überhaupt in Frage stelle. Ich theile dieses Bedenken nicht; die Oxalsäure verhält sich in dem schwach eingedampften bezw. durch Wasserzusatz wieder verdünnten Harn ganz anders wie in dem concentrirten, sie ist weit leichter extrahirbar. Eine Erklärung für das auffallende Verhalten des stark concentrirten Harns vermag ich nicht zu geben; man könnte sich vielleicht vorstellen, dass die grosse Menge Harnstoff eine Art Bindung auf die Oxalsäure ausübt, so dass sie Lösungsmitteln gegenüber weniger zugänglich ist, wie sonst.

Ueber die Darstellung des Thymins.

Von
Walter Jones.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 27. April 1900.)

Die Constitution des Thymins ist trotz der grossen Bedeutung dieses Körpers für den Aufbau der Nucleinsäure¹⁾ noch nicht bekannt. Wenn die chemische Natur dieses bereits im Jahre 1893 von A. Kossel und A. Neumann aufgefundenen Spaltungsproduktes der Nucleinsäure noch so wenig erforscht ist, so ist dies hauptsächlich auf die schwierige Beschaffenheit des Materials zurückzuführen. Ich habe daher, auf den Rath des Herrn Professor A. Kossel hin, versucht, ein Verfahren zu finden, um das Thymin aus complexen Gemengen darzustellen, ohne dass man erst eine Nucleinsäure zu isoliren braucht. Meine Bemühungen in dieser Richtung sind insofern erfolgreich gewesen, als es jetzt möglich ist, den Körper in verhältnissmässig kurzer Zeit und fast in jeder gewünschten Menge zu erhalten, und ich benutze diese Gelegenheit, Herrn Prof. A. Kossel für die Anregung zu dieser Arbeit, für das Material, das er mir zur Verfügung gestellt hat, und für seine fortwährende Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Die erste Methode zur Isolirung des Thymins wurde von A. Kossel und A. Neumann²⁾ angegeben. Nucleinsäure aus Milz wurde 2 Stunden lang bei 150° mit 5%iger Schwefelsäure erhitzt, das Reactionsprodukt zur Entfernung der Basen mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Filtrat die überschüssige Säure mit Baryumhydroxyd entfernt. Das Thymin

1) A. Kossel in Liebreich's Encyklopädie, III. Band, Artikel: Nucleinstoffe.

2) Bericht d. d. chem. Ges., 27 (1894), S. 2217.

wurde dann durch Zusatz einer concentrirten Lösung von Quecksilberniträt unter gleichzeitiger Neutralisation mit Natronlauge niedergeschlagen, der Quecksilberniederschlag mit H_2S zersetzt und das Thymin nochmals durch abwechselnden Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak gefällt. Nachdem das Silber aus der Fällung mit H_2S entfernt war, wurde das Filtrat zur Krystallisation eingeeengt. Doch fanden dieselben Autoren, dass die Darstellung sehr vereinfacht werden kann, wenn man Thymusnucleinsäure 2 Stunden lang bei 170° nur mit Wasser erhitzt, da dann die Fällungen mit Quecksilberniträt und Silbernitrat fortfallen können.

Es wurde sodann von Kossel¹⁾ nachgewiesen, dass der von Miescher aus Salmonucleinsäure dargestellte und von Schmiedeberg²⁾ als «Nucleosin» in die Literatur eingeführte Körper nichts anderes wie das von Kossel und Neumann zuerst aufgefundene Thymin war. Die zu seiner Isolirung benutzte Methode war im Wesentlichen dieselbe, die Kossel und Neumann bei der Thymusnucleinsäure schon früher angewandt hatten, nur dass zur Hydrolyse Salzsäure verwandt wurde, deren nachträgliche Fortschaffung eine besondere Operation erforderte.

Der gewichtigste Einwand, den man der Kossel-Neumann'schen Methode machen kann, ist der, dass sie die Darstellung von Nucleinsäure erfordert; die Methode war ja auch eigentlich nicht für die Gewinnung des Thymins ausgearbeitet, sondern für die Auffindung der hydrolytischen Spaltungsprodukte der Nucleinsäure. Gulewitsch³⁾ hat andererseits ein Verfahren benutzt, welches für nucleinsäurereiches Rohmaterial (Häringstestikel) anwendbar ist. Die feuchten Testikel werden mit Schwefelsäure 8 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht, die Schwefelsäure mit Kalk entfernt und das Filtrat mit soviel Silbernitrat versetzt, als für die völlige Ausfällung erforderlich ist.⁴⁾ Nach Entfernung des Silberchlorids

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII (1896), S. 188.

2) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., 37 (1896), S. 124.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII (1899), S. 180 u. 293.

4) Kossel, diese Zeitschrift, Bd. XXV (1899), S. 179.

wurde die Flüssigkeit mit Baryt gesättigt und der erhaltene voluminöse Niederschlag mit H_2S zersetzt. Die vom Schwefelsilber befreite Flüssigkeit wurde abwechselnd mit Silbernitrat und Ammoniak versetzt, so lange ein Niederschlag entstand, die Silberverbindung von Thymin und Histidin mit H_2S zersetzt und bis zur beginnenden Krystallisation des Thymins eingeengt, wobei das Histidin noch in Lösung blieb.

Diese Methode wurde von Gulewitsch zur Isolirung des Arginins angewandt, das Thymin erhielt er dabei nur als Nebenprodukt; und wenn man diese Methode als Darstellungsweise des Thymins anwenden will, so ist zu bemerken, dass der Niederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak mit äusserster Sorgfalt erzeugt werden muss, da bei ungenügendem Zusatz von Ammoniak Thymin in Lösung bleibt, dagegen bei Ueberschuss von Ammoniak sich das Thyminsilber wieder löst. Ich habe daher bei der Ausarbeitung meiner Methode von der Benutzung dieses Niederschlags abgesehen und ferner noch folgende Anforderungen zu erfüllen gesucht: Anwendbarkeit der Methode direkt auf das nucleinsäurehaltige Rohmaterial ohne vorherige Isolirung der Nucleinsäure und Vermeidung jeder Fällung mit Phosphorwolframsäure. Denn sowohl Kossel¹⁾ wie Gulewitsch²⁾ haben gefunden, dass ein Theil des Thymins vom Phosphorwolframsäureniederschlag mitgerissen wird, während ein anderer Theil in Lösung bleibt. Die folgende Methode vermeidet nun die oben angedeuteten Schwierigkeiten und zeichnet sich durch rasche Ausführbarkeit aus.

1300 g Haringstestikel, schon vorher zur Entfernung des Protamins mit Säure extrahirt, wurden zu je 250 g mit 20%iger Schwefelsäure versetzt, sodass ein dicker Brei entstand, und dann im Autoclaven 2 Stunden auf 150° erhitzt. Dabei wird das Adenin vollkommen zerstört, während Thymin unverändert bleibt.³⁾ Das Reactionsprodukt wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, die dunkelbraune Flüssigkeit durch Filtration

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV (1896), S. 189.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII (1899), S. 293.

3) Kossel und Neumann, loc. cit.

von einer beträchtlichen Abscheidung humusartiger Substanz befreit, sodann mit feinpulverisirtem Baryt bis zur schwach, aber deutlich alkalischen Reaction auf Lakmus versetzt, das Baryumsulfat abfiltrirt, mit kochendem Wasser ausgewaschen und die vereinigten Filtrate eingeeengt oder mit Wasser verdünnt, wie es gerade erforderlich war, bis das Volumen der Lösung für je 100 g trockener Testikel 500 ccm. war. Es lässt sich mit nur geringer Sorgfalt beim Zusatz des Baryumhydroxyds leicht eine Flüssigkeit erhalten, die gegen Lakmus deutlich alkalisch ist, aber mit Kohlensäure keinen Niederschlag gibt. Aber selbst wenn ein geringer Ueberschuss von Baryt hinzugefügt sein sollte, so ist seine Entfernung durch Kohlensäure nicht erforderlich. Im Gegentheil ist es durchaus erforderlich, dass die Concentration der Lösung nicht grösser wie angegeben ist, sonst wird bei dem folgenden Zusatze von Silbernitrat der gelbe Niederschlag von Thyminsilber sofort schwarz und Thymin geht wieder in Lösung. In verdünnterer Lösung hingegen sind die reducirenden Substanzen weniger schädlich, sodass unter den angegebenen Bedingungen der Thyminsilberniederschlag viele Stunden lang mit der Flüssigkeit in Berührung bleiben kann, ohne eine bemerkbare Aenderung zu zeigen. Hierauf wurde eine kleine abgemessene Portion dieser alkalischen Lösung schwach mit Salpetersäure angesäuert. Zu dieser Flüssigkeit liess ich aus einer Bürette allmählich eine 2%ige Silbernitratlösung hinzufließen, bis ein Tropfen der Flüssigkeit, in einen Ueberschuss von Barytlösung gebracht, keinen weissen, sondern einen gelben Niederschlag gab. Auf diese Weise stellte ich die zur völligen Ausfällung erforderliche Menge Silbernitrat fest.

Eine andere und beträchtlich grössere abgemessene Portion der Flüssigkeit wurde jetzt ebenfalls mit Salpetersäure angesäuert und die erforderliche Menge 2%igen Silbernitrats auf einmal hinzugefügt. Ein sofort entstehender dunkelbrauner Niederschlag reisst fast allen Farbstoff aus der Flüssigkeit mit nieder. Dieser Niederschlag möge mit A bezeichnet werden. Das Filtrat hiervon wurde tropfenweise mit Barythydrat versetzt und dabei die Reaction der Flüssigkeit gegen

Lakmus bestimmt. Sobald dieselbe neutral wurde, bildete sich ein zweiter blassgelber flockiger Niederschlag (B) und ein vermehrter Zusatz von Barytwasser rief zunächst nur Zunahme des Niederschlages hervor, während die Reaction noch neutral blieb. Sobald in Folge weiteren Zusatzes eine schwache Alkal-escenz erreicht war, filtrirte ich diesen Niederschlag ab und fuhr dann mit dem Zusatz von Baryt fort. Selbst ein grosser Ueberschuss von Baryt erzeugte jetzt zunächst keinen Niederschlag mehr und erst, wenn eine sehr beträchtliche Quantität Baryt hinzugefügt worden war, entstand ein dritter Niederschlag (C), zuletzt wurde dunkelbraunes Silberoxyd niedergeschlagen. Die drei Niederschläge sowie eine Mischung von B mit C und A wurden mit kaltem Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff unter Druck zersetzt. Nach Entfernung des Schwefelsilbers wurde jede Flüssigkeit für sich auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingeeengt und erkalten gelassen.

In A wurden grosse Mengen Chlorwasserstoff und humin-artige Stoffe gefunden, aber kein Thymin.

Aus B wurden dunkelgraue krystallinische Aggregate erhalten, die nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle eine schöne Krystallisation von dünnen Blättchen von Thymin ergaben.

C dickte beim Abkühlen zu einem farblosen Syrup ein, aber liess keinen festen Körper ausfallen.

Die Mischungen von B mit C und A lieferten Produkte, aus denen Thymin isolirt werden konnte, aber die so erhaltenen Mengen waren sehr viel geringer wie die einer entsprechenden Menge von B allein.

Diese Versuche zeigen, dass das Thymin gänzlich im zweiten Niederschlag enthalten ist und dass der erste und dritte verworfen werden können. Ausserdem ist es nicht nothwendig, soviel Silbernitrat hinzuzufügen, dass auch die letzte Substanz in C niedergeschlagen wird, da durch wiederholte Versuche gefunden wurde, dass die Mengen von Silbernitrat, die für A+B und für A+B+C erforderlich sind, immer im Verhältniss von 10 : 29 stehen.

Der Thyminsilberniederschlag bietet beim Filtriren nicht so grosse Schwierigkeit, wie man sonst bei gelatinösen organischen Silberverbindungen zu finden gewohnt ist. Doch kommt es zuweilen vor, dass man einen Niederschlag erhält, der sich nicht filtriren lässt; dann hat man sicher nicht genug Silbernitrat hinzugesetzt und es ist nur erforderlich, mit Salpetersäure anzusäuern, eine kleine Menge Silbernitrat hinzuzufügen und mit Baryumhydroxyd wie vorher zu fällen. Nach diesem Vorversuch gestaltete sich die Verarbeitung der ursprünglichen alkalischen Flüssigkeit folgendermassen:

Dieselbe wurde mit Salpetersäure angesäuert und zu je 500 ccm. mit der nach obiger Angabe erforderlichen Menge 2%igen Silbernitrates versetzt. Nach Entfernung des Niederschlages wurde Barythydrat bis zur schwach alkalischen Reaction hinzugefügt, der Niederschlag durch Decantiren mit kaltem Wasser gewaschen und an der Pumpe abgesogen. Jede Portion des Niederschlages wurde sofort mit Schwefelwasserstoff unter Druck zersetzt, das Schwefelsilber entfernt, die Filtrate vereint und zur Krystallisation eingedampft. Die erhaltenen krystallinischen Krusten von Thymin wurden aus heissem Wasser mit Thierkohle umkrystallisirt.

Da die Arbeit unterbrochen werden musste, ehe die erhaltene Ausbeute ganz gereinigt war, so ist es mir nicht möglich, ihre Menge genau zu bestimmen. Ein Theil dieses Rohthymins, nach oberflächlicher Schätzung etwa $\frac{1}{20}$ des Ganzen, gab 1,4 g reines Thymin. Hiernach wird man etwa 2% Ausbeute erwarten können.

Die gereinigte Substanz stimmt in Löslichkeit, Krystallform und chemischen Reactionen mit den für Thymin beschriebenen überein und die Reinheit und Individualität der Substanz ist genügend bewiesen durch ihre quantitative Umsetzung in ein Bromsubstitutionsprodukt, $C_5H_5N_2O_2BrH_2O$, welches ich bereits früher beschrieben habe.¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX (1900), S. 20.

Die Benzoylverbindungen der bei der Spaltung der Eiweisskörper entstehenden Amidosäuren.

Von
Dr. Albert Schultze.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.

(Der Redaction zugegangen am 15. Mai 1900.)

Bei der hydrolytischen Spaltung der Eiweisskörper, wie sie durch Einwirkung von Mineralsäuren und Alkalien in der Hitze, einigen Enzymen, speziell durch das Trypsin des Pankreas sowie durch Mikroorganismen bewirkt wird, entsteht regelmässig eine Reihe von Amidosäuren. Die Methoden, welche zum Isoliren dieser Säuren und zu ihrer Reindarstellung zur Verfügung stehen, sind ausserordentlich umständlich und zeitraubend und weit davon entfernt, quantitativ zu sein. Gelegentlich einer Untersuchung über die Trypsinverdauung des Leims, welche ich vor einigen Semestern ausführte, hatte ich selbst Gelegenheit, diesen Mangel zu empfinden. Ich folgte daher gern der Aufforderung des Herrn Professor Dr. Thierfelder, nach Verbindungen der Amidosäuren zu suchen, welche charakteristisch und besser als die bisher bekannten für die Isolirung und Trennung sich erwiesen. Es lag nahe, an die Benzoylverbindungen zu denken, umsomehr, als die Ueberführung des Glycocols in die schwerlösliche Hippursäure bereits mit Erfolg zur Abscheidung dieser leichtlöslichen Amidosäure, welche bei der Spaltung des Leims und anderer Albuminoide in reichlicher Menge auftritt,¹⁾ benutzt worden ist.²⁾

1) Nach den Untersuchungen von K. Spiro (Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. XXVIII, S. 174) entsteht Glykokoll in geringer Menge auch bei der Zersetzung mancher Eiweissstoffe.

2) Charles S. Fischer, Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. XIX., S. 175.
Max Gonnermann, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 59, S. 43.

Edwin S. Faust, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. 41, S. 309.

Als Benzoylirungsmittel benutzt man jetzt vielfach das Benzoylchlorid, welches unter gewissen Bedingungen mit Alkoholen, Phenolen, primären und secundären Aminen, Diaminen in der Weise reagirt, dass Benzoessäureester, resp. substituirte Benzamide entstehen. In sehr bequemer Weise lässt sich die Benzoylirung in vielen Fällen ausführen, wenn man die betreffende Substanz in wässriger Lösung mit Natronlauge und Benzoylchlorid schüttelt (Schotten-Baumann'sche Reaction). Der Erste, welcher die Reaction auf Amidosäuren anwandte, war Baum.¹⁾ Er löste Glycocoll in wenig Wasser, fügte einige Tropfen Natronlauge hinzu, schüttelte mit Benzoylchlorid, welches allmählich im Ueberschuss zugesetzt wurde, und machte schliesslich mit Natronlauge alkalisch. Er fand, dass Glycocoll fast vollständig in Hippursäure übergeht. Um die Hippursäure zu isoliren, wurde die alkalische Flüssigkeit mit einer Mineralsäure angesäuert und dem abgeschiedenen Gemenge von Benzoesäure und Hippursäure mit Aether die Benzoesäure entzogen. In derselben Weise führte Baum die Benzoylirung des Alanins aus. Das durch Salzsäure abgeschiedene Benzoylalanin wurde zur Entfernung der Benzoesäure wiederholt mit Petroläther erhitzt, der Rückstand mit wenig Aether gewaschen und aus heissem Aether umkrystallisirt. Es schieden sich weisse glänzende Blättchen aus. Ueber die anderen uns hier interessirenden Amidosäuren der aliphatischen Reihe macht er keine näheren Angaben. Er sagt nur, «andere Amidosäuren zeigen ein ähnliches Verhalten wie das Glycocoll». Dagegen hat Baum das Benzoylirungsverfahren auch auf das Tyrosin angewandt. Es zeigten sich hier andere Verhältnisse. Die Untersuchung führte zu keinem befriedigenden Resultat.

Später hat Charles S. Fischer²⁾ versucht, mit Hülfe der Schotten-Baumann'schen Methode die Benzoylverbindungen des Leucins und der Glutaminsäure darzustellen. Er versetzte die in überschüssiger 10%iger Natronlauge gelöste Substanz mit Benzoylchlorid unter beständigem Umschütteln so

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. IX, S. 465.

²⁾ a. a. O.

lange in kleinen Portionen, bis der Geruch des letzteren nicht mehr verschwand. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure wurde mit Aether ausgeschüttelt, der Aether abdestillirt und der Aetherrückstand durch längeres Kochen mit Petroläther von der Benzoessäure befreit. Es hinterblieb eine syropförmige Masse, welche in kaltem Wasser unlöslich, in heissem Wasser, Alkohol und Chloroform löslich war und nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte. Von dem aus Glutaminsäure erhaltenen Körper gibt Charles S. Fischer an, dass er in viel heissem Wasser gelöst sich beim Erkalten als Oel wieder abscheide. Die Anwendung des Schotten-Baumann'schen Verfahrens auf die als Zersetzungsprodukte der Eiweisskörper bekannten Amidosäuren, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tyrosin hat also bisher kein positives Resultat ergeben. Das Alanin kommt weniger in Betracht, da es bisher nur bei der Spaltung von Seide nachgewiesen worden ist.

Als meine eigenen Versuche, deren Resultat im Folgenden mitgetheilt werden soll, nahezu abgeschlossen waren, erschien eine Arbeit von E. Fischer¹⁾ «Ueber die Spaltung einiger racemischer Amidosäuren in die optisch-activen Componenten». Um die bei der hydrolytischen Spaltung der Eiweissstoffe auftretenden optisch-activen Amidosäuren synthetisch herzustellen, hat E. Fischer zunächst die künstlichen (racemischen) Amidosäuren in ihre Benzoylderivate verwandelt, diese mit Hülfe ihrer Alkaloid- (Brucin, Strychnin) Salze getrennt und aus den auf diese Weise isolirten optischen Antipoden durch Kochen mit Säure die optisch-activen Amidosäuren erhalten. Er nahm die Benzoylirung bei Gegenwart von Natriumbicarbonat vor und erzielte hiermit sehr gute Ausbeute, während ihm die Anwendung von Alkali nur ganz unbefriedigende Resultate ergab. Auf die Ergebnisse der Untersuchungen von E. Fischer werde ich bei der Beschreibung meiner Versuche eingehen. Sie ermöglichten mir eine Deutung eigenthümlicher Beob-

1) Th. Weyl, Berichte d. d. ch. Ges., Bd. XXI, S. 1529.

2) Berichte d. d. ch. Ges., Bd. XXXII, S. 2451.

achtungen, die ich bei der Benzoylirung der Glutaminsäure machte.

Experimenteller Theil.

Meine Untersuchungen erstrecken sich auf Asparaginsäure, Leucin, Glutaminsäure und Tyrosin. Die letzten drei wurden von mir aus Casein gewonnen. Die Spaltung geschah nach der Vorschrift von R. Cohn¹⁾ durch fünfständiges Kochen mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure am Rückflusskühler, die Isolirung der Amidosäuren im Wesentlichen nach den Angaben von Hlasiwetz und Habermann.²⁾ Die Asparaginsäure wurde von Kahlbaum bezogen.

Benzoylleucin.

Die Methoden, welche Baum beim Glycocoll und Alanin anwandte, sowie diejenige, welche Charles S. Fischer beim Leucin und bei der Glutaminsäure versuchte, führten zu keinem Resultat. Es hinterblieben nach dem Auskochen der Benzoesäure nur ölige oder syrupöse Massen, die nicht zur Krystallisation gebracht werden konnten. Ein besseres Ergebniss wurde erzielt, als ich die Benzoylirung in schwach alkalischer Lösung vornahm. 1 g Leucin wurde in einer gut schliessenden Stöpselflasche in 12%iger Natronlauge gelöst und die Lösung unter beständigem Schütteln mit im Ganzen 5 ccm. Benzoylchlorid in einzelnen kleinen Portionen in der Weise versetzt, dass ein neuer Zusatz erst dann erfolgte, wenn der Benzoylchloridgeruch vollständig verschwunden war. Sobald die alkalische Reaction umschlug und sich krystallinische Ausscheidungen zeigten, brachte ich diese durch einen geringen Ueberschuss von Natronlauge in Lösung. Anfänglich vollzieht sich die Reaction ohne Wärmeentwicklung, nach kurzer Zeit jedoch tritt geringe Erwärmung ein. Nach ungefähr 40 Minuten ist die oben

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 161.

²⁾ Liebig's Annalen, Bd. 169, S. 150.

angegebene Menge Benzoylchlorid verbraucht. Nach dem Ansäuern mit concentrirter Salzsäure wird mit einer grossen Menge Aether wiederholt ausgeschüttelt. Bei dem Verdunsten der vereinigten ätherischen Lösungen in einer geräumigen Schale hinterbleibt eine weisse krystallinische Masse, die beim Erwärmen auf dem Dampfbade nach kurzer Zeit den grösseren Theil der Benzoesäure in zarten Kryställchen heraustreten lässt. Diese Krystalle können bequem durch gelindes Blasen mit dem Munde entfernt werden. Von Zeit zu Zeit löst man den Rest wieder in Aether, verdunstet diesen abermals und schafft in derselben Weise die aufs Neue herausgetretenen Efflorescenzen der Benzoesäure fort. In dem Maasse wie letztere verschwindet, wird die Krystallmasse dünnflüssig, bis schliesslich in der Schale ein Oel zurückbleibt, das nur noch eine ganz unbedeutende Menge von Benzoesäure einschliesst. Jetzt wurde das Oel in viel Wasser gelöst und die Lösung etwas concentrirt. Beim Erkalten schied sich Benzoylleucin in Form prismatischer Nadeln oder in Blättchen ab. Ausbeute 70% der Theorie. Die Trennung von Benzoylleucin und Benzoesäure lässt sich auch in folgender Weise bewerkstelligen. Der durch Salzsäure erhaltene Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, im Trockenschrank getrocknet, fein zerrieben und zur Entfernung der Benzoesäure im Kolben wiederholt mit Petroläther ausgekocht. Der Rückstand, der bei dieser Behandlung keine ölige, sondern eine krystallinische Beschaffenheit zeigte, wurde in der Wärme mit Aether wiederholt geschüttelt. Beim Verdunsten verbleibt ein weisser krystallinischer Rückstand, der in heissem Wasser gelöst wieder in derben prismatischen Nadeln oder Blättchen krystallisirte. Ausbeute 78 %. Beim Behandeln der Krystalle mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Wasser kommt es zur Bildung öligler Tropfen, die theils an der Oberfläche schwimmen, theils am Boden liegen. Fügt man mehr Wasser hinzu und kocht, so geht das Oel in Lösung. Beim Erkalten trübt sich die Flüssigkeit milchig, wird aber, je nachdem sich Krystalle ausscheiden, wieder klar. Die mehrfach aus Wasser umkrystallisirte Substanz zeigte im Vacuum über Schwefelsäure keinen

Gewichtsverlust. Die Analyse¹⁾ stimmte gut auf die Formel des Benzoylleucins.

0,1715 g Substanz gaben 0,4184 g CO₂ und 0,1145 g H₂O.

0,2191 g Substanz verbrauchten 9,3 ccm., $\frac{1}{10}$ Normalsäure.

Berechnet für:

Gefunden:

C₁₃ H₁₇ NO₃

C 66,38 %

66,53 %

H 7,23 %

7,41 %

N 5,95 %

5,94 %.

Der Schmelzpunkt liegt bei 135—140°, d. h. die Substanz beginnt bei 135° zu schmelzen und ist bei 140° flüssig. E. Fischer gibt 126—128° an. Im Reagensrohr vorsichtig erhitzt, schmilzt die Substanz zu einem klaren farblosen Oel, das bei weiterem Erhitzen unzersetzt sublimirt und sich an den kälteren Theilen des Glases als Oel niederschlägt. Das Produkt verlangt zur Lösung 690 Theile Wasser von 19°. Die Lösung wurde durch mehrstündiges Schütteln der in Wasser suspendirten fein zerriebenen Substanz im Schüttelapparat hergestellt. Es ist ferner löslich in Alkohol, Aether, Essigäther, Chloroform, schwer löslich in Benzol, unlöslich in Ligroin und Petroläther. Das Benzoylleucin war in alkalischer Lösung optisch-inactiv. Eine Lösung, welche in 26 ccm. 3,0051 g Substanz und die für 2 Moleküle berechnete Menge KOH enthielt, also fast 12%ig war, zeigte keine Einwirkung auf das polarisirte Licht. Das Benzoylleucin bildet mit Basen eine Reihe theilweise gut krystallisirender Salze.

Das Silbersalz wurde durch Eintragen von frisch gefälltem Silberoxyd in eine kochend heisse Lösung der freien Säure gewonnen. Aus dem Filtrat schieden sich beim Erkalten weisse schön ausgebildete Krystalle ab (sechsseitige längliche Blättchen). Durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser, in dem es leicht löslich ist, wurde es gereinigt. Im Trockenschrank bei 100° erhitzt, erleidet es weder Veränderung noch Wasserverlust.

¹⁾ Die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen wurden im offenen Rohr unter Benutzung von Bleichromat, die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt.

0,2955 g Substanz gaben 0,0936 g metall. Silber.

Berechnet:	Gefunden:
Ag 31,67 %	31,64 %.

Bleisalz. Zur Darstellung dieses Salzes wurde Bleicarbonat in eine heisse wässrige Lösung von Benzoylleucin eingetragen und die Mischung einige Zeit im Sieden erhalten. Die filtrirte und etwas eingeengte Lösung scheidet allmählich farblose Krystalle ab. Dieselben sind in einzelnen Drusen angeordnet und bestehen aus radiär gestellten dicht neben einander liegenden Blättchen oder Nadeln. Im Wasser sind sie schwer löslich. Längeres Erhitzen bei 100° bewirkt keine Gewichtsabnahme. Die Bestimmung des Bleis wurde nach Berzelius ausgeführt.

0,204 g Substanz gaben 0,0621 g Pb.

Berechnet:	Gefunden:
Pb 30,66 %	30,48 %.

Das Zinksalz liess sich durch Kochen der wässrigen Lösung des Benzoylleucins mit Zinkcarbonat darstellen. Die Krystalle waren in Wasser leicht löslich und enthielten kein Krystallwasser.

0,238 g Substanz gaben 0,0370 g ZnO.

Berechnet:	Gefunden:
Zn 12,19 %	12,43 %

Das Baryumsalz, durch Kochen der wässrigen Lösung mit Baryumcarbonat gewonnen, ist in Wasser ausserordentlich leicht löslich und konnte nicht krystallinisch erhalten werden. Beim Verdunsten der wässrigen Lösung hinterblieben harte Krusten, die zerrieben ein weisses Pulver darstellten. Dasselbe benetzte sich nur schwer mit Wasser, ging jedoch beim Umrühren leicht in Lösung.

Auch das Kalisalz, durch Sättigen der Säure mit der berechneten Menge Kalilauge dargestellt, zeichnete sich durch grosse Löslichkeit in Wasser und Alkohol aus und konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden. Beim Verdunsten seiner Lösung im Vacuum schieden sich weisse Krusten ab, die an der Luft alsbald zerflossen.

Wässrige Lösungen von Quecksilberchlorid oder Kupfersulfat riefen in der Kalisalzlösung gelblichweisse bezw. grün-

lichblaue amorphe Niederschläge hervor. Dieselben wurden abfiltrirt, ausgewaschen und mit heissem Wasser behandelt. Dabei gingen sie nicht in Lösung, nahmen aber eine wachsartige Beschaffenheit an. Nach dem Erkalten wurden sie wieder fest, das Kupfersalz unter Veränderung seiner Farbe in Grün. Auch das Kupfersalz, das ich durch Kochen der wässerigen Lösung mit frisch gefälltem Kupferoxydhydrat herstellte, zeigte dasselbe Verhalten.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass das Benzoylleucin auch auf einem anderen Weg, nämlich durch Erhitzen von Benzoësäure und Leucin im geschlossenen Rohr auf 200°, von Destrem¹⁾ erhalten worden ist. Die Angaben, die Destrem über diese Verbindung macht, sind aber sehr dürftig.

Benzoylasparaginsäure.

Das Benzoyliren geschah genau in der beim Leucin angegebenen Weise. Zur Isolirung benutzte ich ebenfalls die beiden oben beschriebenen Verfahren. Im ersten betrug die Ausbeute 68%, im zweiten 74% der theoretischen Menge. Ein wesentlich besseres Resultat 89%, wurde erhalten, als bei im Uebrigen gleicher Versuchsanordnung statt der Natronlauge Kalilauge zur Anwendung kam. Aus Wasser krystallisirt die Verbindung in schönen grossen Nadeln, die sternförmig zusammengelagert sind. Das Auftreten eines Oels beim Erhitzen mit Wasser wurde nicht beobachtet. Die Krystalle enthalten kein Krystallwasser. Bei der Analyse gaben sie folgende Werthe:

0,1387 g Substanz lieferten 0,2835 g CO₂ und 0,0590 g H₂O.

0,2040 g Substanz erforderten 8,2 ccm. $\frac{1}{10}$ Normalsäure.

Berechnet für C₁₁H₁₁NO₅:

Gefunden:

C 55,69 %

55,73 %

H 4,64 %

4,72 %

N 5,90 %

5,62 %

Den Schmelzpunkt fand ich bei 182—183°, E. Fischer giebt 180—181° an.

Beim Erhitzen im Reagensrohr schmilzt die Verbindung zuerst und färbt sich dann unter Zersetzung und Verkohlung braun, indem sich ein weisses Sublimat von Benzoësäure zeigt

1) Bulletin de la société de Paris, Bd. XXX, 481, Jahrg. 1878.

und der Bittermandelgeruch des Benzonitrils wahrnehmbar ist. Zur Lösung bedarf die Benzoylasparaginsäure 227 Theile Wasser von 18°, während E. Fischer 261 Theile bei 20° angiebt. Sie ist in heissem Wasser sehr leicht löslich, leicht löslich ferner in Alkohol, Methylalkohol und Essigäther. Beim Erwärmen löst sie sich in Aceton, Amylalkohol und Eisessig. Unlöslich ist sie in Aether, Chloroform, Petroläther, Ligroin und Benzol.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens benutzte ich eine wässrige Lösung, welche 8,197% Substanz und die für 4 Moleküle KOH berechnete Menge Kalilauge enthielt. Das spezifische Gewicht betrug 1,0881. Die Lösung drehte das polarisirte Licht im 22 cm-Rohr bei Natriumlicht um 6,27° nach rechts. Mithin ergibt sich für Benzoylasparaginsäure bei Gegenwart von 4 Molekülen KOH $(\alpha)_D = +34,8$, E. Fischer fand $(\alpha)_D = +37,4$. Der von mir gefundene niedrigere Werth erklärt sich vielleicht durch den grösseren Alkaligehalt der von mir benutzten Lösung.

Das Natronsalz, durch Neutralisiren der Säure mit der berechneten Menge Natronlauge hergestellt, scheidet sich nur aus der sehr concentrirten Lösung in Form harter Warzen ab. Es ist in Wasser leicht löslich, ebenso in Alkohol, aus dem es sich beim Verdunsten als krystallinisches Pulver absetzt. Dasselbe besteht aus regellos durcheinander liegenden feinsten Nadeln.

Bei 100° getrocknet gaben 0,4100 g Substanz 0,2091 g Na_2SO_4 .

Berechnet :	Gefunden :
Na 16,37 %	16,46 %.

Das Kalisalz konnte nur als farbloser Syrup erhalten werden.

Das Silbersalz, durch Kochen mit frisch gefälltem Silberoxyd gewonnen, schied sich aus dem eingeeengten Filtrat in Form radiär gestellter, dicht neben einander liegender Nadeln oder Blättchen ab. Es ist in Alkohol unlöslich. Krystallwasser ist nicht vorhanden.

0,1655 g Substanz gaben 0,0791 g metallisches Silber.

Berechnet :	Gefunden :
Ag 47,89 %	47,79 %.

Auch das Kupfersalz krystallisirt gut. Zu seiner Darstellung wurde die wässerige Lösung der freien Säure mit frisch gefälltem Kupferoxyd gekocht. Das blau gefärbte Filtrat lässt nach entsprechender Einengung bis stecknadelkopfgrosse, runde, dunkelgrüne, seidenglänzende Krystallaggregate, welche nicht an der Wandung des Gefässes haften, austreten. Unter dem Mikroskop erkennt man feine Nadeln, welche von einem Mittelpunkt nach allen Seiten ausstrahlen. In Alkohol ist es unlöslich. Beim Erhitzen im Trockenschrank geht die dunkelgrüne Farbe in ein fahles Grün über und gleichzeitig verliert die Substanz zwei Moleküle Wasser.

0,1695 g wasserfreies Salz gaben 0,0445 g CuO.

Berechnet:	Gefunden:
Cu 21,14 %	20,88 %.

Blei-, Baryum- und Zinksalz, durch Kochen mit den Carbonaten hergestellt, konnten nicht zur Krystallisation gebracht werden. Das Bleisalz ist in heissem Wasser sehr schwer, in Alkohol unlöslich. Der aus der wässerigen Lösung abgeschiedene amorphe Niederschlag wurde im Trockenschrank getrocknet und analysirt.

0,2195 g Substanz gaben 0,1497 g PbSO₄.

Berechnet:	Gefunden:
Pb 46,83 %	46,56 %.

Das Baryumsalz ist in Wasser sehr leicht löslich. Die wässerige Lösung wurde durch Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde durch Lösen in Wasser und Füllen durch Alkohol gereinigt und im Trockenschrank getrocknet.

0,423 g Substanz ergaben 0,2623 g Ba SO₄.

Berechnet:	Gefunden:
Ba 36,82 %	36,45 %.

Das Zinksalz ist in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich.

Benzoylglutaminsäure.

Die ersten Versuche wurden nach dem Verfahren von Baum ausgeführt. Das Produkt, welches nach dem Auskochen mit Petroläther gewonnen wurde, war in Alkohol und Wasser leicht löslich. Beim Verdunsten der alkoholischen Lösung

hinterblieb ein hellgelbes, zähes Oel, das keine Neigung zum Krystallisiren zeigte. In seiner mit Kalilauge neutralisirten wässerigen Lösung rief salpetersaures Silber eine weisse, krystallinische Fällung hervor. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, in Wasser suspendirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Beim Einengen des Filtrats blieb ein Syrup zurück, der zuweilen auf Zusatz von Aether zu einer krystallinischen Masse erstarrte, zuweilen aber durchaus nicht krystallisirt erhalten werden konnte. Ein besser krystallisirendes Produkt wurde gewonnen, als ich auf die Glutaminsäure das oben beschriebene Verfahren anwandte. Nachdem aus dem Reaktionsgemisch die durch Salzsäure zur Abscheidung gebrachte Benzoesäure abfiltrirt war, schieden sich nach mehrtägigem Stehen prismatische Krystalle der Benzoylglutaminsäure ab. Die Ausbeute betrug 55% der Theorie.

In einem anderen Versuch wurde nach Beendigung der Benzoylirung und Ansäuern mit Salzsäure mit Aether ausgeschüttelt, der Aether verdunstet, aus dem Rückstand in oben beschriebener Weise die Benzoesäure weggeblasen und die zurückbleibende Masse in warmem Wasser gelöst. Beim Erkalten schied sich zunächst noch etwas Benzoesäure, dann Benzoylglutaminsäure ab. Auch die Mutterlauge lieferte beim Eindampfen noch weitere Krystalle; schliesslich bleibt ein zähes Oel zurück, das nicht mehr krystallisirt. Die Krystalle schmelzen bei 98°. Sie verloren im Vacuum bei einer Temperatur, die dem Schmelzpunkt nahe liegt, ein Molekül Krystallwasser.

0,6305 g Substanz verloren 0,0435 g H₂O,

für C₁₂H₁₃NO₆ + H₂O

berechnet:

gefunden:

H₂O 6,69%

6,89%.

Die krystallwasserfreie Verbindung lieferte folgende Zahlen: 0,1234 g Substanz ergaben 0,2590 g CO₂ und 0,0594 g H₂O. 0,189 g verbrauchten 7,2 ccm. 1/10 Normalsäure.

Berechnet für C₁₂H₁₃NO₆:

Gefunden:

C 57,37%

57,21%

H 5,17%

5,34%

N 5,57%

5,33%.

Der Schmelzpunkt der wasserfreien Verbindung liegt bei 152—154°.

Im Reagensrohr erhitzt verhält sich die Benzoylglutaminsäure ebenso wie Benzoylasparaginsäure. Bei 18° bedarf sie etwa 95 Theile Wasser zur Lösung. Nach E. Fischer löst sich der Körper in 124 Theilen Wasser von 20°. Er ist leicht löslich in Methyl-, Aethyl- und Amylalkohol, ebenso in Eisessig, Aceton, Essigäther, schwerer löslich in Aether und Chloroform; in Petroläther, Ligroin, Benzol, Benzin unlöslich. Die Benzoylglutaminsäure war in alkalischer Lösung optisch-inactiv. Eine Lösung, welche in 26 ccm. 2,0922 g Substanz und die für zwei Moleküle berechnete Menge KOH enthielt, zeigte keine Einwirkung auf das polarisirte Licht. Die eben beschriebene Säure zeigt ganz dieselben Eigenschaften, Krystallwassergehalt, Schmelzpunkt wie diejenige, welche von E. Fischer bei der Benzoylirung der racemischen Glutaminsäure gewonnen war. Es ist also während des Benzoylirungsprocesses in ausgedehntem Maasse eine Racemisirung eingetreten. Das stimmt genau mit den Angaben von E. Fischer überein, welcher bereits feststellte, dass beim Benzoyliren der natürlichen Glutaminsäure ein Gemenge von optisch-activen und racemischen Benzoylverbindungen entsteht. Vermuthlich lag in dem von mir erhaltenen nicht krystallisirenden Oel die active Form der Benzoylglutaminsäure vor. Vielleicht ist bei der Benzoylirung des Leucins auch eine Racemisirung eingetreten; dafür spricht die optische Inactivität des von mir erhaltenen Benzoylleucins. Eine Entscheidung wird erst getroffen werden können, wenn die Benzoylverbindung des racemischen Leucins vorliegt.

Die Salze der Alkalien und alkalischen Erden sind in Wasser sehr leicht löslich und konnten nicht krystallisirt erhalten werden.

Das Silbersalz fällt als weisser krystallinischer Niederschlag auf Zusatz von Silbernitrat zu der mit Kalilauge neutralisirten Säure. Es wurde aus heissem Wasser umkrystallisirt.

0,2274 g Substanz ergaben 0,105 g met. Silber.

	Berechnet:	Gefunden:
Ag	46,45%	46,17%.

Das Zinksalz krystallisirt in feinen farblosen Nadeln. In Wasser ist es schwer löslich, in Alkohol unlöslich.

0,2465 g Substanz ergaben 0,0629 g ZnO.

	Berechnet:	Gefunden:
Zn	20,70%	20,44%

Amorph ist das Cadmiumsalz, welches durch Umlegen des Barytsalzes mit Cadmiumsulfat hergestellt wurde.

0,2375 g des beim Verdunsten der wässerigen Lösung im Exsiccator zurückbleibenden Salzes gaben 0,0945 g CdS.

	Berechnet:	Gefunden:
Cd	31,02%	30,94%

Ebenfalls amorph ist das in Wasser unlösliche Bleisalz. Durch Auswaschen mit Wasser konnte es gereinigt werden.

Bei 100° getrocknet gaben 0,3725 g Substanz 0,2463 g PbSO₄.

	Berechnet:	Gefunden:
Pb	45,39%	45,15%

Dibenzoyltyrosin.

Bei dem Tyrosin erhielt ich zunächst ein völlig negatives Resultat. Das Verfahren, welches bei den Amidosäuren der Fettreihe zum Ziel geführt hatte, versagte hier, wenigstens gelang es mir nicht, aus dem Reaktionsgemisch ein einheitliches Produkt zu isoliren. Das Ergebniss wurde sofort ein anderes als statt der Natronlauge Kalilauge zur Anwendung kam. Gleich der erste in dieser Weise ausgeführte Versuch ergab eine Ausbeute an Dibenzoyltyrosin von 93% der Theorie. Die weiteren scheinbar ebenso ausgeführten Benzoylirungen missglückten wieder, bis es mir schliesslich gelang, festzustellen, dass die Bildung nur dann erfolgt, wenn ununterbrochen eine schwach alkalische Reaction¹⁾ herrscht. So wie die Reaction auch nur vorübergehend sauer wird, scheidet sich ein reichlicher Niederschlag aus, der auch nach sofortigem Zusatz von Alkali nicht wieder in Lösung geht und dessen Untersuchung noch nicht beendet ist. Nimmt man die Benzoylirung unter den angegebenen Cau-

1) Bei stark alkalischer Reaction scheint ein Benzoesäurerest in die Amidogruppe einzutreten und ein Benzoyltyrosin zu entstehen. Mit der Untersuchung dieses Körpers bin ich noch beschäftigt.

telen vor, so entsteht regelmässig Dibenzoyltyrosin, allerdings in wechselnden Mengen (35—93% der Theorie). Um die Verbindung zu isoliren, wurde die alkalische Flüssigkeit mit Salzsäure versetzt, der entstehende Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet, mit Petroläther ausgekocht, der in Petroläther unlösliche Theil in Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung mit Wasser versetzt. Es entstand sofort ein lockerer weisser krystallinischer Niederschlag, der aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt wurde. Die Krystalle erscheinen unter dem Mikroskop als feine Nadeln. Krystallwasser ist nicht vorhanden.

0,1275 g Substanz gaben 0,3307 g CO_2 und 0,0579 g H_2O . 0,205 g verlangten 5,3 ccm. $\frac{1}{10}$ Normalsäure.

Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}$:

C	70,95%
H	4,88%
N	3,59%

Gefunden:

70,66%
5,04%
3,61%

Nach der Analyse liegt ein Dibenzoyltyrosin vor, und zwar ist je ein Benzoessäurerest in die Hydroxyl- und Amidogruppe eingetreten. Dass ersteres der Fall ist, geht daraus hervor, dass die Verbindung beim Kochen mit Millon'schem Reagens sich nicht mehr roth färbt. Der Schmelzpunkt liegt bei 211—212°. Im Reagensrohr vorsichtig erhitzt, schmilzt Dibenzoyltyrosin zuerst und färbt sich dann bräunlich unter Abgabe eines gelblichen Dampfes, der in öligen Tropfen sich wieder an den kälteren Wandungen absetzt. Der Geruch nach bitteren Mandeln ist auch hier deutlich wahrzunehmen.

In kaltem Wasser ist es völlig unlöslich, in heissem lösen sich nur Spuren, leicht löslich in Alkohol, Methylalkohol, Essigäther, Aceton, Eisessig, weniger löslich in Benzol und Aether, unlöslich in Petroläther und Ligroin. Die Substanz dreht rechts, zu einer quantitativen Bestimmung reichte das Material nicht aus.

Das Kalisalz ist in Wasser leicht löslich. Es scheidet sich aus der wässerigen Lösung erst nach starkem Concentriren aus, und zwar als gallertartige Masse. Unter dem Mikroskop erkennt man von einem Centrum aus wellenförmig verlaufende

lange Fäden. Auch in Alkohol ist es leicht löslich. Beim langsamen Verdunsten des Alkohols krystallisierte es in schönen federförmig angeordneten Nadeln oder Säulen.

Die bei 100° getrocknete Substanz ergab bei einer Menge von 0,2755 g 0,0548 g K_2SO_4

Berechnet:
K 9,13%

Gefunden:
8,89%.

Das Cadmiumsalz fiel auf Zusatz von gelöstem Cadmiumsulfat zur Lösung des Kalisalzes als weisse gallertartige Masse aus. Sie wurde abfiltriert, gewaschen und in heissem Alkohol gelöst. Es scheiden sich kleine Warzen ab, die einen zusammenhängenden Bodensatz bilden. Mikroskopisch bestehen diese Warzen aus einem Haufwerk langer feinsten Nadeln, die eine radiäre Anordnung erkennen lassen, aber auch durcheinander gefilzt sind.

Von dem bei 100° getrockneten Salz gaben 0,176 g 0,029 g CdS.

Berechnet:
Cd 12,61%

Gefunden:
12,78%.

Es ist mir eine willkommene Gelegenheit, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Thierfelder, für das bei meiner Arbeit mir bewiesene Wohlwollen und Interesse auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Ueber das Oxydationsprodukt des Glycogens mit Brom.

Von

W. Niebel,

Kreisthierarzt beim Königlichen Polizei-Präsidium zu Berlin.

(Der Redaction zugegangen am 15. Mai 1900.)

Chittenden¹⁾ will durch Oxydation von Glycogen mit Brom eine Säure erhalten haben, welcher er den Namen Glycogensäure gibt. Der genannte Autor liess in einem geschlossenen Gefäss Brom bei 100° auf Glycogen einwirken und erhielt dadurch eine nicht krystallisirende Säure, aus der er das Calcium-, Baryum-, Cadmium-, Kobalt-, Mangan- und Bleisalz darstellte.

Aus seiner Analyse ist ersichtlich, dass er eine Säure von der Zusammensetzung $C_6H_{12}O_7$ erhalten hat, welche in allen Salzen, mit Ausnahme des Bleisalzes, einbasisch auftrat. Chittenden glaubt zu dem Schluss berechtigt zu sein, dass die von ihm erhaltene Säure von der Gluconsäure und Dextron-säure nicht erheblicher verschieden sei, als diese beiden selbst von einander.

Vielfach ist die Ansicht ausgesprochen worden, dass die von Chittenden aus dem Glycogen durch Oxydation mit Brom erhaltene Säure wahrscheinlich nichts weiter sei als die Gluconsäure. Da aber der Beweis hierfür bis jetzt noch nicht erbracht worden ist, so führte ich auf Veranlassung des Herrn Geheimrath Professor Dr. E. Fischer einige Untersuchungen aus, welche von denjenigen Chittenden's insofern abwichen, als die angewandte Brommenge eine geringere und die Zeit

¹⁾ Liebig's Annalen der Chemie, Bd. 182, S. 206.

der Erhitzung auf 100° eine kürzere war. Da ferner die Oxydation unter fortwährendem Schütteln besser von Statten geht, so wurde die Mischung in eine Schüttelmaschine gebracht, in die ein permanenter Strom von Wasserdampf geleitet wurde.

Es wurden 5 g Glycogen mit 30 g Wasser und 5 g Brom in der angeführten Weise 2 Stunden geschüttelt, dann nochmals 5 g Brom hinzugesetzt und wieder $\frac{1}{2}$ Stunde geschüttelt.

Die so erhaltene Flüssigkeit, welche stark sauer reagierte und nach Bromoform roch, wurde durch Erwärmen unter Umrühren von dem freien Brom und mittelst Bleicarbonat von dem Bromwasserstoff befreit. Zur Entfernung des in Lösung gegangenen Bleis wurde Schwefelwasserstoff in die Flüssigkeit geleitet. Nachdem aus dem Filtrat der Schwefelwasserstoff vermittelst hindurchgeleiteten Luftstroms beseitigt worden war, wurde die Flüssigkeit im Vacuum bei 40—45° C. eingeengt. Von der zurückgebliebenen, schwach gelb gefärbten, stark sauer reagirenden, syrupösen Flüssigkeit wurde die eine Hälfte zur Darstellung des Kalksalzes benutzt, während die andere Hälfte mit Phenylhydrazin behandelt wurde.

Zur Darstellung des Kalksalzes wurde die Säure mit Calciumcarbonat im Ueberschuss versetzt und 15 Minuten auf einer kleinen Flamme gekocht. Die heiss filtrirte, auf dem Wasserbade eingedampfte Flüssigkeit wurde, nachdem sie mit einigen Körnchen gluconsaurem Kalk eingimpft worden war, in den Exsiccator behufs Krystallisation gestellt.

Nach einigen Tagen bemerkte man eine geringe Ausscheidung eines Kalksalzes. Die Ausbeute war aber eine so schlechte, dass sie zur Analyse nicht hinreichte.

Die zweite Hälfte wurde mit 3 g Phenylhydrazin $1\frac{1}{2}$ Stunde auf dem Wasserbade erhitzt und bei gewöhnlicher Temperatur 24 Stunden stehen gelassen. Die abgeschiedenen Krystalle wurden von der Flüssigkeit abfiltrirt, mit Wasser, etwas Alkohol und Aether gewaschen, sodann in heissem Wasser gelöst, die Lösung mit etwas Thierkohle versetzt und heiss filtrirt. Die erhaltenen Krystalle, welche noch gelblich gefärbt waren, wurden nochmals aus Wasser umkrystallisirt und waren

nun ganz farblos. Der Schmelzpunkt der Krystalle lag bei raschem Erhitzen zwischen 198 und 202° C.

Im Aeussern sowohl, wie im Schmelzpunkt entspricht die Substanz dem Glyconsäurephenylhydrazid. Die Identität mit letzterem wurde durch die Analyse bestätigt.

Gefunden:	Berechnet für $C_{11}H_{18}N_2O_6$:
50,44% C	50,34% C
6,38% H	6,29% H
10,21% N	9,79% N.

Es ist somit erwiesen, dass Glycogen, analog verschiedenen anderen Kohlenhydraten, durch Oxydation mit Brom in Gluconsäure übergeht.

Die schlechte Ausbeute an Gluconsäure nach diesem Verfahren (durchschnittlich 1,2 g Hydrazid aus 5 g Glycogen) liess vermuthen, dass die gebildete Bromwasserstoffsäure auf die Gluconsäure zerstörend gewirkt hatte. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden 6 g Gluconsäure mit einer dem Brom entsprechenden Menge Bromwasserstoffsäure versetzt, 2 $\frac{1}{2}$ Stunden einer Temperatur von 100° ausgesetzt und das gebildete Produkt zur Herstellung des Hydrazids in der gleichen, oben angegebenen Weise behandelt.

Aus einer 5 g Glycogen entsprechenden Menge Gluconsäure wurden auf diese Weise nur 0,97 g Gluconsäurephenylhydrazid erhalten. Es ist hierdurch der Beweis erbracht, dass Bromwasserstoffsäure die Gluconsäure bei längerer Einwirkung von 100° C. zerstört, und somit die Ursache der erhaltenen geringen Ausbeute klargestellt.

Ein besonderes Interesse dürfte diesem Oxydationsprodukt des Glycogens bei der Beurtheilung der Aetiologie einer dem Pferde eigenthümlichen Krankheit, der Hämoglobinämie, zukommen. Diese pflegt nach vorhergegangener mehrtägiger Ruhe besonders dann aufzutreten, wenn in dieser Zeit die Fütterung eine intensive ist. Die Krankheit äussert sich darin, dass die aus dem Stalle kommenden Thiere nach kurzer Arbeitszeit auf der Nachhand zu zittern beginnen und häufig

niederstürzen, ohne dass es gelingt, die Pferde wieder zum Aufstehen zu bringen. Der pathologische Befund ist derjenige einer schweren Muskelentzündung, mit der ein Freiwerden des an die rothen Blutzellen gebundenen Blutfarbstoffes Hand in Hand geht.

Nach der allgemeinen Annahme¹⁾ handelt es sich bei dieser Krankheit um eine Autointoxication, indem die Vorstufe des die Krankheit verursachenden Agens sich durch die Ruhe und intensive Ernährung im Muskel anhäuft und bei der Arbeit, namentlich in der kalten Jahreszeit, in das schädlich wirkende Substrat übergeht. Diese Hypothese findet ihre Begründung in der Thatsache, dass durch geeignete Prophylaxe — theilweise Entziehung des Kraftfutters und Bewegung während der Ruhetage — der Ausbruch der Krankheit vermieden werden kann.

Die Natur des toxigenen Körpers ist bis jetzt unbekannt; dass derselbe jedoch wahrscheinlich eine Säure ist, geht daraus hervor, dass mit grossen Gaben basischer Salze (doppeltkohlensaures Natron) bis jetzt der beste therapeutische Effect erzielt worden und die Mortalitätsziffer seit Anwendung genannten Mittels ganz erheblich zurückgegangen ist. Nun ist durch mich²⁾ ermittelt worden, dass sich gerade die Muskulatur der Pferde durch einen hohen Glycogengehalt (bis 1%) auszeichnet. In Folge der Ruhe und intensiven Fütterung findet eine Anhäufung dieses Körpers statt. Bei der Arbeit, vielleicht neben gleichzeitiger Einwirkung von Kälte, dürfte eine erhöhte Oxydation des Glycogens angenommen werden und das Produkt derselben — die Gluconsäure oder ein höheres Oxydationsprodukt — dürfte demnach mit grosser Wahrscheinlichkeit als die Ursache dieser dem Pferdegeschlechte eigenthümlichen Krankheit anzusprechen sein.

1) W. Eber, Die Autointoxicationen der Thiere. Arch. f. wiss. u. prakt. Thierheilk. Bd. 24, H. 3 u. 4, 1898.

2) Ueber den Nachweis des Pferdefleisches in Nahrungsmitteln, Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene, 1891, S. 185 u. 210.

Ueber Krystalle aus Taubenblut.

Von

Arthur Schwantke.

Assistent am mineralogischen Institut der Universität Marburg.

Mit Tafel II, Fig. 1—4.

(Der Redaction zugegangen am 16. Mai 1900.)

Die bisherige Kenntniss der verschiedenen Blutkrystalle beruht ausschliesslich auf mikroskopischer Beobachtung. Die zahlreichen Publicationen über den Gegenstand geben zum Theil ein anschauliches Bild der charakteristischen Gestalten dieser Gebilde, es war auch möglich, durch Winkelmessungen unter dem Mikroskop und durch Beobachtung der optischen Erscheinungen für einzelne Krystalle das System und zum Theil auch die krystallographische Form zu ermitteln. Vorbildlich hierfür waren besonders die Beobachtungen v. Lang's¹⁾ über Krystalle aus dem Menschen-, Meerschweinchen-, Hunde-, Kaninchen- und Eichhörnchenblut, die später von Donogány²⁾ wiederholt und fortgesetzt worden sind; diese und andere, wie die Untersuchungen Ewald's,³⁾ zeigen aber zugleich die Grenze des für die mikroskopische Deutung überhaupt Erreichbaren, sobald es sich nicht um reguläre Krystalle handelt, deren Deutung auch unter dem Mikroskop möglich ist, wie

¹⁾ Sitzungsber. d. mathem.-naturw. Classe d. Kais. Akad. d. Wissenschaften, Bd. XLVI, II. Abth., Wien 1863, S. 85f.

²⁾ Zur Kenntniss der Hämoglobin- und Hämochromogenkrystalle. Math. és term. tud. Érsitő 1892/93, 11, 262—287; mathem. u. naturw. Berichte 1892/93, 11, 135—160. — Citirt nach d. Ref. in der Zeitschr. f. Krystallographie, 1894, 23, 499.

³⁾ Polarispektroskopische Untersuchungen an Blutkrystallen. Zeitschrift für Biologie, 1886, 22 (N. F. 14), 459f.

sie von R. Panebianco¹⁾ aus dem Blute von *Bombyx Mori* beschrieben wurden.²⁾

Herr Professor A. Kossel hatte die Güte, mir im Dezember vorigen Jahres Krystalle aus Taubenblut zur Untersuchung zu übergeben, die sich zu einer eingehenderen makroskopischen Beobachtung eigneten.

Die Krystalle waren bis 2 mm. lang und besaßen für die Messung am Goniometer genügend spiegelnde Flächen. Die der Flüssigkeit entnommenen Krystalle waren weich und leicht zerdrückbar, nach dem Trocknen etwas fester. Um sie vor einer Zersetzung und Zerstörung zu bewahren, wurden sie in der Flüssigkeit vorsichtig an den Rand des Glases geschwemmt, mit einem Streifen Filtrirpapier aufgenommen und auf einem Uhrglase, das in durch Eis gekühltes Wasser gestellt war, durch Absaugen der anhaftenden Flüssigkeit mit dem Rande des Papiers getrocknet. Sämmtliche Beobachtungen am frischen Material wurden im physiologischen Institut der Universität Marburg in einem von Herrn Professor Kossel freundlichst zur Verfügung gestellten Zimmer bei einer zwischen 5 und 10° C. liegenden Temperatur angestellt. Für die Messung am Goniometer wurden die Krystalle mit einer Mischung von Wachs und Vaseline aufgenommen und vor der Berührung mit der warmen Hand durch übergezogenen Handschuh geschützt. Es erfolgte zunächst die optische Untersuchung am Mikroskop, die auch nach der goniometrischen Messung wiederholt wurde, und in allen Fällen dem ersten Resultate entsprach und bewies, dass sich die Krystalle während der Dauer der Messung frisch erhalten hatten.

Die Krystalle erschienen im durchfallenden Licht dunkel-

1) Ueber Blutkrystalle. *Rivista di Min. e. Crist. ital.* di Panebianco, 1895, 14, 81. — *Zeitschr. f. Kryst.*, 1897, 28, 198.

2) H. U. Kobert: Ueber das mikrokrystallographische Verhalten des Wirbelthierblutes, Leipzig 1900 (erw. Abd. aus *Zeitschr. f. ang. Mikroskopie*, V, 6—10), enthält eine Zusammenstellung der Litteratur und Beschreibung der verschiedenen Krystallarten, zum Theil auch auf Grund eigener Beobachtungen des Verfassers, ohne auf die genaueren krystallographischen Verhältnisse, namentlich das optische Verhalten, einzugehen.

roth — dicke Krystalle auch nahezu undurchsichtig — und zeigten nur sehr schwachen Pleochroismus, übergehend in ein etwas helleres Roth. Demgemäss waren sie (den Beobachtungen Ewald's [loc. cit.] zufolge) als Oxyhämoglobin aufzufassen, was von Herrn Professor Kossel durch spektroskopische Untersuchung bestätigt werden konnte. Die Auslöschung im parallelen polarisirten Licht erfolgte parallel der Kante m/m (Taf. II Fig. 1 und 2). Im convergenten Licht erwiesen sich die Krystalle als einaxig, indem beide m -Flächen kein Axenbild, sondern das Verhalten parallel der Axe geschnittener Platten zeigten; die Beobachtung durch beide Flächen war allerdings wegen der tafeligen Gestalt der meisten Krystalle nur in wenigen Fällen möglich. Schnitte senkrecht zur Axe waren von den Krystallen nicht zu gewinnen, es gelang aber in zwei Fällen Krystalsplitter zu erhalten, die im convergenten Licht bei der Drehung des Tisches gerade über das Gesichtsfeld hingehende Balken zeigten. Breit gedrückte Krystalle zeigten undulöse Auslöschung und wurden nach einiger Zeit isotrop.

Die krystallographische Untersuchung ergab die Zugehörigkeit der Krystalle zur sphenoidischen (tetraëdrischen) Hemiëdrie des tetragonalen Systems. Der Winkel m/m , sowie der Winkel der oberen p -Flächen zu m_2 und der der unteren zu m_1 betrug 90° , der Winkel der oberen p -Flächen (zu einander bzw. zu m_1) war gleich dem der unteren (zu einander bzw. zu m_2). Die Krystalle sind also Combinationen eines tetragonalen Prismas $m = (110)$ mit einem Sphenoid $p = + (111)$.

In Folge der unvollkommenen Signale waren die Messungen einer ziemlich beträchtlichen Schwankung unterworfen. Es zeigte sich dabei aber — dem tetragonalen System entsprechend — ein Unterschied zwischen den rechten Winkeln und den Winkeln der p -Flächen, indem die letzteren in weit höherem Maasse, ungefähr innerhalb einer Grenze von 2 Graden, schwankten, was durch die unvollkommene Flächenbeschaffenheit allein nicht erklärt werden kann. Ein Unterschied der oberen von den unteren p -Flächen zeigte sich dabei nicht.

Als wahrscheinlichster Mittelwerth der gemessenen besten

8 Krystalle darf der Winkel $p:m = (111):(110) = 31^\circ$ (Normalenwinkel) gelten, was insofern mit der Messung gut übereinstimmt, als die zuverlässigste Messung aus der Reihe der Beobachtungen von $p:p = (111):(\bar{1}\bar{1}\bar{1})$ einen Werth von $118^\circ 06'$ ergab, was einem Werth von $p:m = 30^\circ 57'$ entsprechen würde. Aus dem Winkel 31° berechnet sich das Axenverhältniss $a:c = 1:1,175$ und der Winkel $p:p = (111):(\bar{1}\bar{1}\bar{1}) = 108^\circ 18'$, gemessen $106^\circ 39'$.

Die meisten Krystalle zeigen nicht die ideale Form der Fig. 1 und 2. Sie sind in der Regel der Gefäßwand anliegend gewachsen und zeigen dann an der aufliegenden Seite eine höchstens m vicinale oder ganz schief gelegene Fläche, die ziemlich eben und glänzend aussieht, aber am Goniometer unschwer als Scheinfläche erkannt wird. Die Krystalle erhalten dann eine unsymmetrisch erscheinende Gestalt, wie sie Fig. 4 veranschaulicht. Freigewaschene Krystalle zeigen in der Regel eine ungleichartige Ausdehnung der p-Flächen wie Fig. 3 (die wie 4 mit horizontaler c-Axe gezeichnet ist).

Charakteristisch sind an den Krystallen kleine Pyramiden, die sich auf den Prismenflächen am spitzen Ende erheben, wie Fig. 2 zeigt. Sie werden gebildet von einer Fläche P, die mit der gegenüberliegenden p-Fläche einspiegelt [P_1 mit $p(111)$], sowie von zwei anderen Flächen π , die sehr unvollkommen ausgebildet sind, gerundet und gestreift, so dass eine nähere Bestimmung am Goniometer unmöglich ist, die aber im Allgemeinen auf der Prismenfläche senkrecht und mit den p-Flächen des betreffenden Krystallendes parallel zu sein scheinen. Die Erscheinung wurde ziemlich häufig und zum Theil auf beiden Prismenflächen, wie in Fig. 2, beobachtet. Beide Pyramiden würden einem Sphenoid ohne Prisma entsprechen, es würde also eine parallele Fortwachsung der Krystallsubstanz vorliegen.¹⁾

Die Krystalle hielten sich, im Gläschen bei kalter Temperatur aufbewahrt, mehrere Wochen. Nach 3 Monaten waren

1) Ergänzungszwillinge der sphenoidischen Tetartoëdrie anzunehmen, liegt jedenfalls kein Grund vor, so lange die Prüfung durch Aetzfiguren, wie am vorliegenden Material, unmöglich ist.

sie verändert, hart, spröde und fast undurchsichtig, nur bei sehr geringer Dicke noch mit rother Farbe durchscheinend, aber im polarisirten Licht völlig isotrop. Die Flächen waren dagegen durchaus glänzend und spiegelnd geblieben, so dass die Krystalle für die goniometrische Messung noch geeignet waren. Die nochmalige Messung des einen Krystalls ergab ein mit den am frischen Krystall gemessenen Werthen übereinstimmendes Resultat.

Auch die durch v. Lang (loc. cit.) beschriebenen Krystalle aus Meerschweinchenblut zeigten eine sphenoidische Gestalt, indessen wurde die Zugehörigkeit zum rhombischen System durch das optische Verhalten bewiesen und durch Donogány (loc. cit.) bestätigt. Bojanowski¹⁾ bildet sphenoidisch aussehende Krystalle aus dem Blute des Raben ab (Taf. XXX Fig. 12) und bemerkt (S. 335), dass er ähnliche Krystalle aus Taubenblut erhalten habe. Wie weit diese mit den oben beschriebenen übereinstimmen, ist daraus nicht zu schliessen.

Es erscheint wünschenswerth, dass es gelänge, auch die Krystalle anderer Blutarten, sowie aus demselben Blute die Krystalle der anderen Modificationen oder Verbindungen des Hämoglobins zu untersuchen. In physikalischer Beziehung scheinen die Blutkrystalle die interessanten Eigenschaften anderer eiweissartiger Körper zu theilen. Das Quellungsvermögen und die Fähigkeit, Lösungen fremder Stoffe aufzunehmen, wie es von den Albuminen bekannt ist,²⁾ scheint, schon den Beobachtungen Reichert's³⁾ zufolge, auch den Blutkrystallen eigen zu sein. Vielleicht ist auch die oben beschriebene Weichheit der Krystalle und die Schwankung in den Winkelwerthen

1) Beobachtungen über die Blutkrystalle. Zeitschr. für wissensch. Zoologie, 1863, XII, 312f.

2) Vergl. u. A. Schimper, Ueber die Krystallisation der eiweissartigen Substanzen. Zeitschr. für Kryst., 1881, 5, 131f. und Wichmann, Ueber die Krystallform der Albumine. Zeitschr. für physiol. Chemie, 1899, Bd. XXVII, S. 575f.

3) Beobachtungen über eine eiweissartige Substanz in Krystallform. Müller's Archiv für Anat. u. Physiol., 1849, 187f.

Fig.1

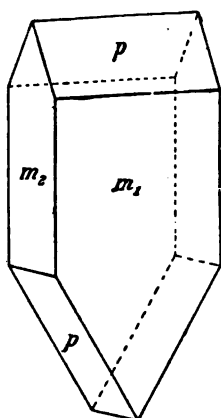


Fig.2

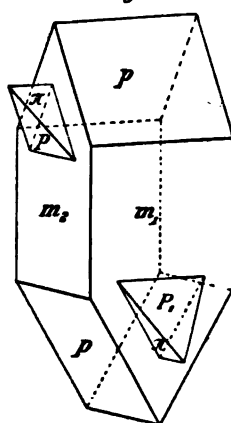


Fig.3

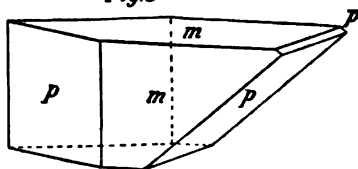


Fig.4

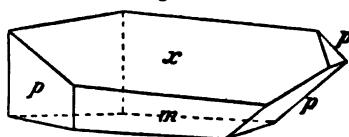


Fig.5

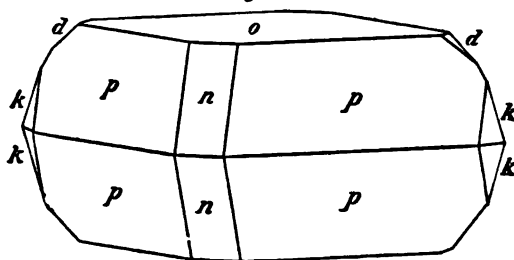
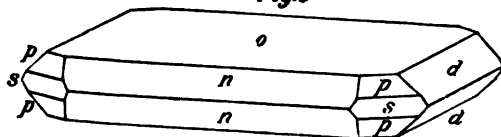


Fig.6



A. Schwantke del.

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie,
Band XXIX.
Zu «Schwantke, Ueber Krystalle aus Taubenblut».

Verlag von Karl J. Trübner
Strassburg.

hierdurch zu erklären. Zur näheren Untersuchung würde es allerdings eines Materials bedürfen, wie es nur unter besonders günstigen Umständen zu erhalten sein wird. Die oben beschriebenen Krystalle waren zu weiteren Versuchen nach dieser Richtung hin ungeeignet. Jedenfalls verdienen aber alle diese Körper auch das Interesse des Krystallographen in hohem Grade.

Herrn Professor A. Kossel sei auch an dieser Stelle für die gegebene Anregung und freundliche Unterstützung herzlicher Dank ausgesprochen!

Marburg, den 15. Mai 1900.

Tafelerklärung.

- Fig. 1. Ein Krystall des Oxyhämoglobins aus Taubenblut in tafeliger Ausbildung nach der einen Prismenfläche. Combination $p + (111)$, $m (110)$.
- Fig. 2. Dieselbe Combination mit den Prismenflächen im Gleichgewicht. Auf den letzteren die einer parallelen Fortwachsung entsprechenden von den Flächen des Sphenoids gebildeten Pyramiden.
- Fig. 3. Ein frei gewachsener Krystall derselben Combination mit ungleich entwickelten p -Flächen.
- Fig. 4. Ein unvollkommen ausgebildeter Krystall derselben Combination, gewachsen auf der Scheinfläche x .

Fig. 3 und 4 sind mit horizontaler c -Axe gezeichnet.

Zur folgenden Abhandlung:

- Fig. 5. Ein Krystall des Histidinmonochlorids. Combination: $p (111)$, $o (001)$, $n (101)$, $k (121)$, $d (012)$. Axenverhältniss: $a:b:c = 0,76665:1:1,71104$.
- Fig. 6. Ein Krystall des Histidindichlorids. Combination: $o (001)$, $n (101)$, $d (012)$, $p (111)$, $s (110)$. Axenverh.: $a:b:c = 0,76537:1:1,77516$.
-

Zur Krystallform des Histidindichlorids.

Von

Arthur Schwantke.

Mit Tafel II, Fig. 5 und 6.

(Der Redaction zugegangen am 16. Mai 1900.)

In dieser Zeitschrift 1899, Bd. XXVIII, S. 386 wurden die Krystalle des Histidindichlorids von mir beschrieben, die mir von Herrn Prof. A. Kossel und Herrn Dr. Fr. Kutscher freundlichst zur Untersuchung übergeben worden waren, und dabei auf Grund der Vergleichung mit den Krystallen des Histidinmonochlorids die Ansicht ausgesprochen, dass beide Substanzen im Verhältniss der Morphotropie stehen. Es war mir bei diesen Untersuchungen noch unbekannt, dass sich die Krystalle der ersteren durch das Fehlen des Krystallwassers von denen der letzteren unterscheiden. Die Uebereinstimmung in der krystallographischen Form ist darum um so auffallender und scheint mir am besten durch die Annahme erklärt zu werden, dass das zweite Molekül Salzsäure in den Krystallen des Histidindichlorids die Rolle des Krystallwassers spielt. Es wäre dann besser von Isomorphismus der Krystalle zu sprechen. Die Uebereinstimmung ist, wie die Winkel- und Axenwerthe beweisen, thatsächlich vorhanden. Auch in der Figur wird sie deutlich, wenn beide Krystalle in derselben Projection gezeichnet werden, was in Fig. 5 und 6, Taf. II, geschehen ist. Ein Unterschied der beiden Substanzen besteht auch in der Existenz einer vollkommenen Spaltbarkeit nach der Basis bei den Krystallen des Monochlorids (die mir Herr Prof. Kossel gütigst zur Verfügung stellte), die sich auch durch einen perlmutterartigen Glanz auf der Basis andeutet, während eine solche an den Krystallen des Dichlorids nicht beobachtet werden konnte.

Marburg, den 15. Mai 1900.

Ueber das Verhalten einiger künstlicher Hexosen im Thierkörper.

Von
A. Münch.

(Aus dem Laboratorium von Prof. M. Nencki in Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 19. Mai 1900.)

In letzter Zeit ist die Chemie der Kohlehydrate, abgesehen von besserer Kenntniss der Structur und der Verwandlungen der natürlichen in der Natur vorkommenden Kohlehydrate, noch durch künstlich im Laboratorium erhaltene bereichert worden. Es existirt eine reiche Literatur über das Schicksal der natürlichen Kohlehydrate im Organismus, dasselbe ist recht eingehend studirt worden, während die künstlich erhaltenen Kohlehydrate in dieser Hinsicht noch gar nicht untersucht worden sind. Ihr Verhalten im lebenden Organismus stellt jedoch unzweifelhaft ein grosses Interesse dar. Das Studium dieses Verhaltens wird Thatsachen ergeben hinsichtlich der Fähigkeit der Zellen, Substanzen umzuwandeln, die nur feine Structurunterschiede aufweisen. Durch Einverleibung von Kohlehydraten, die nur durch molekulare Configuration sich von einander unterscheiden, müssen wir einen tieferen Einblick in die chemische Thätigkeit der Zellen, ihre Anpassungsfähigkeit resp. Vermögen, neue Enzyme zu bilden, erhalten. — Wir bringen ihnen, den bis jetzt verarbeiteten nahe verwandte, neue Verbindungen und je nachdem die Zellen des Thierkörpers sie zu utilisiren im Stande sein werden oder nicht, werden sie im Organismus zurückgehalten oder durch die Nieren ausgeschieden. — Aber abgesehen von der rein theoretischen Seite könnten solche Versuche auch praktischen

Werth haben. Es kann die Zeit kommen — wie die Geschichte der natürlichen und künstlichen Farbstoffe und Heilmittel lehrt —, wo die im Laboratorium hergestellten, künstlichen Zuckerarten eine erfolgreiche Concurrenz, in Bezug auf die Herstellungskosten, den natürlichen machen werden. In erster Linie wird es sich darum handeln, ob die künstlichen Zucker den gleichen Nährwerth wie die natürlichen haben.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend hat mich Prof. Nencki veranlasst, das Schicksal einiger künstlich dargestellten Hexosen im Organismus zu erforschen. Meine Untersuchungen wurden mit der Formose, Methose und dem β -Methylglycosid ausgeführt. Herrn Prof. Nencki, unter dessen unmittelbarer Leitung ich arbeitete, sage ich meinen herzlichen und tiefgefühlten Dank. Desgleichen spreche ich meinen aufrichtigen Dank aus seinen Assistenten N. O. Sieber-Schoumoff und J. Zaleski für ihre Hülfe bei meinen Untersuchungen. —

Meine Hauptaufgabe bestand darin, klarzulegen, in welchem Maasse die Formose, Methose und das Methylglycosid vom Organismus utilisirt werden d. h. ob sie in demselben, sowie die natürlichen Kohlehydrate, verbrennen oder aber irgend welche Unterschiede darbieten werden; da aber bei der Umwandlung der Kohlehydrate der Leber die bedeutsame Rolle eines Regulators des Gehaltes an Zucker im Blute zukommt, so war zu bestimmen, in welchem Maasse die künstlich erhaltenen Kohlehydrate Glycogenbildner sein können. Der Gang sowie das Verfahren bei der Anstellung der Versuche war vollkommen deutlich von den Autoren vorgezeichnet worden, die sich mit dem Schicksal der natürlichen Kohlehydrate im Organismus beschäftigt haben. Die Versuche wurden im Allgemeinen folgendermaassen angestellt: dem Versuchsthier (einem Kaninchen, in seltenen Fällen einem Hunde) wurde die zu untersuchende Substanz in bestimmten Mengen und unter bestimmten Bedingungen entweder in d. v. jugularis oder in die v. mesenterica oder per os eingeführt; in den letzten zwei Fällen wurden die Versuche theils an gefütterten, theils an hungernden Thieren angestellt. Die Versuche mit Einführung der Lösungen in die Venen wurden unter Beobachtung sämt-

licher antiseptischer Cautelen ausgeführt. Um den Einfluss anderer Factoren auf das Resultat der Versuche auszuschliessen, wurden sämtliche Thiere unter gleiche Ernährungsbedingungen gestellt und unter gleichen Bedingungen gehalten. Wurden die Versuche an gefütterten Kaninchen angestellt, so wurden dieselben 3 Tage vorher isolirt und mit Hafer und Heu gefüttert. Dasselbe Futter wurde auch während der ganzen Dauer der Beobachtung gereicht. Unmittelbar vor dem Versuch wurde dem Thier mittelst eines Katheters Harn entnommen und qualitativ auf Eiweiss und Zucker untersucht. Hier muss bemerkt werden, dass bei den meisten normalen Kaninchen der Harn, bei Abwesenheit von Zucker in ihm, recht bedeutende reducirende Eigenschaften besitzt. Alsdann wurde der Harn in bestimmten Zwischenräumen nach 3—4, 6—8 Stunden nach der Einführung der zu untersuchenden Substanz, entnommen und auf den Zuckergehalt untersucht, im Falle von Vorhandensein desselben wurde seine Menge sowie sein Charakter bestimmt. Die Untersuchung der einzelnen Harnportionen wurde noch einige Zeit nach Aufhören der Zuckerausscheidung fortgesetzt, um die volle Gewissheit zu erlangen, dass im Harn weiter kein Zucker auftritt. Im Falle, dass die Bedeutung der Substanz als Glycogenbildner klargelegt werden sollte, wurde den Thieren, nach vorhergehendem Hungern und nach der Fütterung mit einer der Substanzen die Leber entnommen und auf den Glycogengehalt untersucht, wobei zum Vergleich stets Kontrollthiere von annähernd dem gleichen Gewicht unter genau denselben Bedingungen gehalten wurden. Ausserdem wurde der Einfluss der verschiedenen Verdauungssäfte (Ptyalin, Pepsin, Pancreatin, Darmsaft) auf die zu untersuchende Substanz in vitro bestimmt. Es wurden natürliche Verdauungssäfte benutzt, die von nach dem Verfahren von Prof. Pawlow operirten Hunden gewonnen wurden. Für die liebenswürdig ertheilte Erlaubniss, die in seinem Laboratorium vorhandenen Verdauungssäfte zu benutzen, bitte ich Prof. Pawlow meinen aufrichtigen Dank entgegen nehmen zu wollen. Die Einzelheiten der Untersuchungen sind aus den weiter unten angeführten Befunden ersichtlich.

Die Formose, deren ich mich bei meinen Versuchen bediente, wurde im Wesentlichen nach den Angaben von C. A. Lobry de Bruyn und Alberda van Eckenstein¹⁾ dargestellt. Die von mir gemachten unbedeutenden Veränderungen sind aus der Beschreibung ersichtlich. 500 ccm. einer 40%igen Lösung von Formaldehyd wurden mit 5 Liter Wasser und 20 g frisch bereitetem Bleioxydhydrat vermischt und im Verlaufe von 1½—2 Stunden auf dem kochenden Wasserbade gelassen. Die abfiltrirte Flüssigkeit wurde alsdann auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft; dem auf diese Weise erhaltenen Syrup wurde ein gleiches Volumen eines Gemisches von Methyl- und Aethyl-Alkohol und darauf Aether hinzugefügt, um nach Möglichkeit die Bleisalze aus der Lösung zu entfernen. Die von Neuem von den ausgefallenen Salzen abfiltrirte Lösung wurde auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft. Da eine vollkommene Befreiung des erhaltenen Syrups von den Bleisalzen sogar durch mehrfach wiederholte Bearbeitung desselben mit einem Gemisch von Aether und Alkohol nicht erreicht werden konnte, so musste dafür ein anderer Weg eingeschlagen werden, da die Verunreinigung des Präparates, wenn auch mit geringen Mengen Bleisalzen, dasselbe, aus verständlichen Gründen, für physiologische Versuche untauglich machte. Das von mir angewandte Verfahren bestand in Folgendem: Zu der wässerig-alkoholischen Lösung der auf oben erwähnte Weise erhaltenen Formose wurde tropfenweise stark verdünnte H_2SO_4 hinzugefügt, so lange sich ein weisser Niederschlag von $PbSO_4$ bildete; alsdann wurden noch einige Tropfen überschüssiger H_2SO_4 hinzugefügt. Das Nichtvorhandensein von Pb wurde durch H_2S geprüft, der Ueberschuss von H_2SO_4 durch eine Lösung von $BaCl_2$; im Falle sich Baryum in Lösung erwies, wurde eine gewisse Menge Na_2CO_3 zugesetzt und darauf die nunmehr selbst von Spuren von Bleisalzen freie Lösung auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft. Der abgekühlte Syrup wurde in einem Scheidetrichter mit Aether

1) Rec. trav. chim. Pays-Bas 18, 309—310. 1899.

geschüttelt, um eventuelle Spuren flüchtiger Fettsäuren zu entfernen, und der in die Formoselösung übergegangene Aether auf dem Wasserbade verdampft. Die auf diese Weise erhaltene Formose wurde im Exsiccator bis zum constanten Gewicht getrocknet. Die Untersuchung ergab, dass die Eigenschaften derselben vollkommen übereinstimmten mit den von den Autoren beschriebenen, welche mit ihr gearbeitet haben. Ihre Consistenz war syrupartig. Ihr Reduktionsvermögen war in Bezug auf Fehling'sche Lösung gleich 0,9 der Glycose; sie war optisch inactiv und gährte nicht mit Hefe. In Wasser löste sie sich leicht, in absolutem Alkohol schwer, in Aether löste sie sich gar nicht. Mit einer alkoholischen Lösung von Resorcin gab sie bei Anwesenheit von concentrirter HCl eine violettrothe Färbung. Die aus ihr erhaltenen Osazone schmolzen bei 100—110° C.; bei weiterer Reinigung wurden Osazone erhalten mit einem Schmelzpunkt von 130—144° und von 200°, was vollkommen mit den Angaben von E. Fischer¹⁾ und O. Loew²⁾ übereinstimmt. Wir hatten somit für unsere Versuche zwar keinen reinen Zucker, aber im Gemisch von Hexosen von der Formel $C_6H_{12}O_6$ doch vorwiegend die Formose.

Die Lösung für die Versuche wurde vorher bereitet, wobei stets ihr Reduktionsvermögen und ihr optisches Verhalten geprüft wurde, sowie der Schmelzpunkt der erhaltenen Osazone.

In der Tabelle 1 sind die Resultate angeführt, welche an gefütterten Kaninchen nach Injection von Formoselösungen in die v. jugularis und die v. mesenterica erhalten worden sind, wobei behufs Ausschliessung von Einflüssen der Individualität beide Versuche nach einander an demselben Kaninchen ausgeführt wurden.

Die grösste Menge Zucker wurde im Harn 3—4 Stunden nach der Injection von Formose beobachtet, einerlei ob dieselbe in die v. jugularis oder in die v. mesenterica eingeführt wurde. Nach 6 Stunden wurden im Harn nur Spuren von Zucker gefunden, nach 8 Stunden war derselbe gar nicht mehr vorhanden. Aus vorliegender Tabelle ist ersichtlich,

1) B. B. 21. 989.

2) B. B. 22. 479.

Tabelle 1.

Nr. des Versuchs	Nr. des Kaninchens	Gewicht	Dauer der Injection	Menge der eingeführt. Formose	Menge der Flüssigkeit	Benennung der Vene	Die im Harn ausgeschiedene Zuckermenge	Schmelzpunkt d. Osazon im Harn	Optisches Verhalten	Verhalten zur Hefe	Charakter des Zuckers
1	1	2142	8'	1,5	20	v. jug.	1,2 g	110°	inactiv	keine Gähr.	Formose
2	1	2142	8'	1,5	20	v. mes.	1,41 »	204°	Rechtsdreh.	Gährung	Glycose
3	2	1895	10'	1,0	10	v. mes.	1,05 »	204°	Rechtsdr. + 28' 1)	Gährung	Glycose
4	2	1895	10'	1,0	10	v. jug.	0,67 »	110°	inactiv	keine Gähr.	Formose
5	3	1744	5'	1,0	10	v. mes.	1,06 »	—	Rechtsdr. + 32'	—	Glycose
6	3	1744	5'	1,0	10	v. jug.	0,72 »	—	inactiv	—	Formose
7	4	1962	2'	1,0	10	v. mes.	1,08 »	204°	Rechtsdr. + 30'	Gährung	Glycose
8	4	1962	4'	1,0	10	v. jug.	0,62 »	—	inactiv	—	Formose
9	5	1754	10'	0,5	5	v. mes.	0,55 »	—	Rechtsdr. + 36'	—	Glycose
10	5	1754	10'	0,5	5	v. jug.	0,32 »	100°	inactiv	—	Formose
11	6	1750	8'	1,0	10	v. mes.	1,02 »	—	Rechtsdr. + 26'	Gährung	Glycose
12	6	1750	10'	1,0	10	v. jug.	0,76 »	—	inactiv	—	Formose
13	7	1652	6'	1,0	10	v. mes.	0,98 »	205°	Rechtsdr. + 26'	—	Glycose
14	8	1781	10'	1,0	10	v. mes.	1,01 »	205°	Rechtsdr. + 28'	Gährung	Glycose

dass bei Einführung der Formose in die v. jugularis der weitaus grösste Theil derselben im Harn unverändert auftritt, bei Einführung derselben in die v. mesenterica im Harn stets Glycose gefunden wurde und zwar in einer diejenige der eingeführten Formose um Einiges übersteigenden Menge. Der Charakter des im Harn auftretenden Zuckers wurde stets mit möglichster Sorgfalt bestimmt. Nach Injection der Formose in die v. jugularis wurde aus dem Harn stets bei Erwärmen mit essigsauerm Phenylhydrazin und essigsauerm Natrium Osazon erhalten in Form eines gelben krystallinischen Pulvers mit einem Schmelzpunkt von 100—110°; dabei gährte der Harn bei Zusatz von Hefe nicht und war optisch inactiv. Bei Einführung der Formose in die v. mesenterica gährte der erhaltene Harn mit Hefe, drehte die Polarisationssebene nach rechts und gab Osazon in Form von gelben, nadelförmigen Krystallen. Diese Osazone wurden, nach Auswaschung derselben auf dem Filter mit kaltem Wasser, von Neuem in einem heissen Gemisch von Methyl- und Aethylalkohol aufgelöst.

1) Bei einer Tubuslänge von 10 cm.

Aus dieser Lösung fielen bei Zusatz von H_2O und Entfernung des Alkohols vollkommen homogene Nadeln des Osazons aus. Nach gründlicher Auswaschung auf dem Filter wurden dieselben bis zum constanten Gewicht im Exsiccator getrocknet. Ihr Schmelzpunkt lag (bei Erwärmung im Verlaufe von 10 Min.) bei 204° — und die Elementaranalyse ergab folgendes Resultat:

Berechnet für $C_{18}H_{22}N_4O_4$	Gefunden
C — 60,33%	59,95%
H — 6,15%	6,28%
N — 15,6 %	15,5 %.

Wir hatten somit in der einen Reihe der Versuche unzweifelhaft im Harn mit der unveränderten Formose zu thun, in der anderen Reihe mit d-Glycose.

Die Vergleichung der von mir erhaltenen und eben dargelegten Befunde mit den sich auf das Schicksal der d-Glycose unter denselben Bedingungen beziehenden Litteraturangaben weist auf ein verschiedenes Verhalten des thierischen Organismus der Formose und der d-Glycose gegenüber hin. Diese Verschiedenheit ist eine sehr interessante. Wir wissen, dass die in eine periphere Vene eingeführte d-Glycose fast vollständig im Harn wiedererscheint. Bei Einführung derselben in das Pfortadersystem wird im Harn entweder gar kein Zucker gefunden oder aber nur recht unbedeutende Mengen. Dieses Verhalten wurde zuerst durch Cl. Bernard als auch besonders durch Schöpfer¹⁾ in einer Reihe sorgfältig angestellter Versuche erwiesen. Schöpfer experimentirte an Kaninchen, er führte denselben in die v. cruralis 10 cem. einer 15%igen Lösung von d-Glycose im Verlauf von 10—15 Min. ein und untersuchte darauf nach 3—4 Stunden den Harn auf den Gehalt an derselben. Nach einigen Tagen wurde demselben Kaninchen unter denselben Bedingungen dieselbe Menge d-Glycose in die v. mesenterica eingeführt und wiederum nach 3—4 Stunden der Harn untersucht. Aus einer Reihe ähnlicher und übereinstimmender Versuche Schöpfer's hat sich unzweifelhaft herausgestellt, dass bei Einführung der Glycose

¹⁾ Beiträge zur Kenntniss der Glycogenbildung in der Leber. Bern, 1872. Inaug.-Diss.

in eine periphere Vene dieselbe als solche vollständig mit dem Harn ausgeschieden wird, bei Einführung in das Pfortadersystem wird sie von der Leber zurückgehalten. Durch Berechnung kommt Schöpfer zum Schluss, dass die Leber eines Kaninchens von mittlerer Grösse im Verlauf einer Minute 0,12 g Zucker zurückhalten kann. Ungeachtet dessen, dass ich bei meinen Versuchen ebenso wie Schöpfer verfuhr, war das Verhalten des Organismus zu der in die v. mesenterica eingeführten Formose ein durchaus anderes als zur Glycose. Die d-Glycose wird in den Versuchen Schöpfer's zurückgehalten, die Einführung der Formose jedoch führt zum Auftreten von d-Glycose im Harn, ruft sozusagen eine zeitweilige Glycosurie hervor, wobei die Menge der d-Glycose im Harn unzweifelhaft grösser ist als die Menge der eingeführten Formose. Diese zeitweilige Glycosurie wird sogar von kleinen Gaben Formose nach sehr langsamem Einführen derselben hervorgerufen. Ich nahm in einigen Fällen die Gaben um das $1\frac{1}{2}$ fache kleiner als Schöpfer und führte dieselben mit einer Schnelligkeit von 0,05 g in einer Minute (bei Schöpfer 0,12 in einer Min.) ein und dennoch erhielt ich Glycosurie. Bei Einführung der Formose in die v. jugularis ging dieselbe, wie auch die Glycose in ähnlichen Fällen, unverändert in den Harn über.

Ein Versuch mit Injection der Formose in die v. mesenterica wurde auch an einem Hunde gemacht. Zu diesem Versuche wurde ein Hund von 3476 g Gewicht genommen und demselben im Verlaufe von 10 Min. 1,0 g Formose in die v. mesenterica eingeführt. Durch den Harn wurden 0,26 g Zucker ausgeschieden, welcher sich als Formose herausstellte. Der Schmelzpunkt des Osazons war 110° . Der Harn war optisch indifferent und gährte nicht. Aus diesem freilich einzigen Versuch resultirt, dass der Organismus des Hundes und des Kaninchens in diesem Falle ein verschiedenes Verhalten zur in die v. mesenterica eingeführten Formose zeigt.

Um dieses verschiedene Verhalten des Organismus zur Formose und Glycose bei Einführung derselben in die v. mesenterica zu untersuchen, stellte ich dieselben Versuche mit Einführung in die v. mesenterica an hungernden Kaninchen an,

die Bedingungen waren dieselben wie bei den ersten Versuchen. Tabelle 2 weist die erhaltenen Befunde auf.

Tabelle 2.

Nr. des Kaninchens	Gewicht vor dem Hungern	Gewicht nach dem Hungern	Dauer des Hungerns	Dauer der Einspritzung	Menge der eingeführten Formose	Menge der Flüssigkeit	Menge des Zuckers im Harn	Schmelzpunkt des Osazons	Optisches Verhalten	Verhalten zu Hefe	Charakter des Zuckers
1	1739	1618	3 Tage	5'	1,0	10 ccm.	0,18	110°	inactiv	keine Gähr.	Formose
2	1792	1649	„	10'	1,0	10 „	0,08	110°	„	„	„
3	1549	1421	„	10'	1,0	10 „	0,12	—	„	„	„
4	1846	1724	„	10'	0,5	10 „	0	—	—	—	—

Bei hungernden Thieren tritt folglich die in die v. mesenterica eingeführte Formose entweder im Harn gar nicht auf, oder falls sie auftritt, so in unbedeutender Menge; d-Glycose geht dabei nicht in den Harn über.

Bevor ich irgend welche Schlüsse mache, halte ich es für nothwendig, vorher Befunde anzuführen, welche sich auf meine Untersuchung sowohl bezüglich der Formose als auch der Methose und des Methylglycosids beziehen.

Das Verhalten des Organismus zur Formose wurde bei Einführung derselben in den Magen sowohl gefütterter als auch hungernder Kaninchen untersucht. Aus Tabelle 3 sind die erhaltenen Resultate ersichtlich.

Ungeachtet dessen, dass die Formose bei ihrer Einführung in den Magen, ebenso wie bei der Injection in die v. mesenterica in das Pfortadersystem gelangt, sind die an gefütterten Thieren bei verschiedenem Verfahren der Einführung erhaltenen Resultate verschieden. Bei ihnen erscheint, wie oben gezeigt worden ist, bei Einführung der Formose in die v. mesenterica, im Harn d-Glycose in einer der eingeführten fast entsprechenden Menge; bei Einführung der Formose in den Magen wird dagegen der grösste Theil derselben vom Organismus zurückgehalten. Der Theil, der im Harn ausgeschieden wird, ist unveränderte Formose. Ein recht wesentlicher Unterschied. Bei den Versuchen mit hungernden Thieren fällt dieser

Unterschied fort; bei beiden Arten der Einführung sind die Resultate ähnliche. Aus den Tabellen ist ausserdem ersichtlich, dass das hungernde Thier im Harn einen geringeren Procentsatz der erhaltenen Formose ausscheidet als das gefütterte. Die Ausscheidung der Formose wird bei Eingabe in den Magen verzögert, so dass Spuren derselben noch 12 Stunden nach der Eingabe im Harn gefunden werden.

Tabelle 3.

Nr. des Kaninchens	Gewicht vor dem Hungern	Gewicht nach dem Hungern	Dauer des Hungerns	Menge der eingeführten Formose	Menge der Flüssigkeit	Menge im Harn	Schmelzpunkt des Osazons	Optisches Verhalten	Verhalten zu Hefe	Charakter des Zuckers
1	1347	—	—	0,5	30	0,08	110°	inactiv	keine Gährung	Formose
2	1970	—	—	1,0	20	0,05	110°	„	„	„
3	2340	—	—	0,5	20	0	—	„	„	„
4	1544	—	—	0,5	10	0,04	—	„	„	„
5	2115	—	—	1,0	10	0	—	„	„	„
6 (4) ¹⁾	1544	—	—	2,0	20	0,38	110°	„	„	„
7	1895	—	—	3,0	20	0,59	—	„	„	„
8 (7)	1895	—	—	2,0	20	0,28	—	„	„	„
9	1720	—	—	4,0	20	0,68	110°	„	„	„
10 (4, 6)	1544	1420	27g.	2,0	20	0,14	110°	„	„	„
11(4, 6, 10)	—	—	3 „	6,0	40	0,36	—	„	„	„
12 (2)	1970	1786	2 „	3,0	20	0,17	—	„	„	„
13 (2, 12)	—	—	3 „	6,0	40	0,34	—	„	„	„
14 (9)	1720	—	2 „	4,0	30	0,28	—	„	„	„
15 (9, 14)	1720	—	1 „	2,0	20	0,21	—	„	„	„
16 (3)	2340	—	1 „	2,5	20	0,39	110°	„	„	„
17 (3, 16)	—	—	2 „	2,5	20	0,26	—	„	„	„
18	1995	1821	2 „	3,0	20	0,31	110°	„	„	„
19	2215	2170	2 „	4,0	20	0,34	110°	„	„	„

Dieselben Versuche mit Formose werden auch an gefütterten Hunden angestellt.

¹⁾ Die Zahlen in den Klammern bedeuten, dass dieses Kaninchen zum Versuch unter der bezeichneten Nummer benutzt worden war. — Das Hungern war ein absolutes.

Tabelle 4.

Nr.	Gewicht	Menge der Formose	Menge des Zuckers im Harn	Osazone	Optisches Verhalten	Verhalten zu Hefe	Charakter des Zuckers
1	40950	1,0	0,28	Schmelzp. 110°	inactiv	keine Gährung	Formose
2	40950	4,5	0	—	—	—	—
3	5300	2,0	0	—	—	—	—
4	5340	1,0	0	—	—	—	—
5	5340	6,0	2,08	Schmelzp. 110°	inactiv	keine Gährung	Formose

Das Verhalten ist folglich dasselbe wie bei Kaninchen. Ein Unterschied ist nur darin vorhanden, dass bei Hunden nach grossen Gaben Formose rasch vorübergehende Durchfälle auftreten, was niemals bei Kaninchen der Fall war. Spuren von Formose sind im Falle ihres Vorhandenseins im Harn noch 12—14 Stunden nach der Eingabe derselben gefunden worden.

Ich gehe jetzt zu den Versuchen zwecks Klarlegung der Frage, ob die Formose als Quelle für die Glycogenbildung in der Leber dienen kann, über. Salomon¹⁾ liess bei seinen Versuchen über die Bildung des Glycogens die Thiere $3\frac{1}{2}$ bis 4 Tage hungern; am 2. Hungertage wurde denselben $\frac{1}{3}$ der für den Versuch bestimmten Substanzmenge gegeben, die übrigen $\frac{2}{3}$ wurden in zwei Portionen am 3. Tage gegeben und die Thiere darauf 12 Stunden nach der letzten Eingabe getödtet und die Leber auf den Glycogengehalt untersucht. Ein längeres Hungern hält Salomon für zwecklos, da er sich an Kontrollversuchen davon überzeugt hatte, dass bereits nach einem dreitägigen Hungern die Leber des Kaninchens stets vollkommen frei von Glycogen war. Külz²⁾ jedoch hält eine Hungerzeit von 3 Tagen für ungenügend und lässt seine Versuchskaninchen 6 Tage hungern; die zu untersuchende Substanz wurde den Thieren am 6. Tage in mehreren Portionen gereicht;

¹⁾ Virchow's Archiv, 61, 36. 1874.

²⁾ Beiträge zur Kenntniss des Glycogens. Separat-Abdruck. Marburg 1891.

12 Stunden nach der letzten Eingabe wurde das Thier getödtet und die Leber auf Glycogengehalt untersucht. Von den 3 von mir angestellten Versuchen habe ich 2 nach den Angaben von Salomon und einen nach Külz gemacht. Die quantitative Bestimmung des Glycogens wurde von mir mit geringen Veränderungen nach dem Verfahren von Brücke und Külz gemacht. Die Leber wurde sofort nach dem Tode des Thieres rasch herausgenommen und unverzüglich in einem Mörser mit heissem Sande verrieben, zur verriebenen Masse wurde alsdann kochendes Wasser hinzugefügt, das Ganze auf ein Wasserbad gestellt und von Neuem verrieben, darauf wurde eine geringe Menge verdünnter Essigsäure zugefügt und durch ein Faltenfilter filtrirt. Diese Operation wurde 3—4 Mal wiederholt; kurz so lange, bis die Reaction des Filtrats auf Glycogen mit J+JK schwach ausfiel. Alsdann wurde das Filter mit den Niederschlägen in einem Mörser von Neuem verrieben, wobei etwas Alkali zugefügt wurde; darauf wurde die Masse mit Essigsäure schwach angesäuert und die Flüssigkeit abfiltrirt. Dieses alles wurde so lange fortgesetzt, bis das Filtrat keine Reaction mit J+JK gab, zu welchem Zweck diese Operation 3—4 Mal wiederholt werden musste; im Uebrigen wurde Alles genau nach den Angaben Brücke's gemacht.

Tabelle 5.

Nr. des Kaninchens	Dauer des Hungerns	Gewicht vor dem Hungern	Gewicht nach dem Hungern	Menge der eingeführten Formose	Menge d. H ₂ O eingef. mit der Formose	Nach wie viel Stund. d. Th.n. d. letzi. Eing. getödt.	Gewicht der Leber	Menge des Glycogens in der Leber	Bemerkungen
1	4	1970	1768	12	120	12	62	0,456 g	{ Hungerte von 18. I.—22. I. Eingabe von Formose 4 g 20. I. Zweimal à 4 g 21. I.
2	4	1956	1701	Kontrollversuch			32	0.	Hungerte von 18. I.—22. I.
3	4	1762	1518	12	120	12	42	0,257 g	{ Hungerte von 14. I.—18. I. Eingabe von Formose 4 g 16. I. Zweimal à 4 g 17. I.
4	kam während des Versuches um								
5	6	1540	1218	12	120	12	48	0,241 g	{ Hungerte von 17. I.—24. I. Formose 23. I. in 4 Portionen
6	5	1544	1242	Kontrollversuch			28	0	Hungerte von 17. I.—24. I.

Die erhaltenen Befunde beweisen, wie aus der Tabelle ersichtlich, die unzweifelhaft vorhandene Fähigkeit des hungernden Organismus des Kaninchens, die eingenommene Formose in Form von Glycogen in der Leber abzulagern. Die Zahl der Versuche in dieser Richtung zu vermehren, hielt ich für überflüssig, da auch die vorhandenen vollkommen genügen, die eben gemachten Schlussfolgerungen mit vollem Recht zu ziehen.

Tabelle 6.

Versuche, betr. das Verhalten der Formose zu den Verdauungsfermenten.

Benennung des Verdauungs-saftes	Nummer	Menge der Formose	Menge des Verdauungs-saftes	Zeit des Verweilens im Thermostat	Verhalten zum polarisierten Licht	Verhalten zu Hefe	Schmelzpunkt der Osazone	Anmerkung
Speichel	1	1 g	5 ccm.	10 Stunden	inactiv	keine Gärung	110°	Chloroform zugefügt
„	2	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	3	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	4	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
Magensaft	5	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	6	2 „	10 „	8 „	„	„	„	„
„	7	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	8	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	9	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	10	2 „	10 „	6 „	„	„	„	„
„	11	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	12	1 „	5 „	10 „	„	„	„	„
Pancreassaft	13	2 „	10 „	10 „	„	„	144°	„
„	14	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	15	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	16	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
Darmsaft	17	1 „	5 „	6 „	„	„	110°	„
„	18	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	19	1 „	5 „	10 „	„	„	„	„
„	20	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„

In Anbetracht des verschiedenen Verhaltens der Formose im Organismus bei Einführung derselben in die v. mesenterica

und in den Magen war es wünschenswerth, ihr Verhalten zu den Verdauungssäften, mit denen sie im Magendarmkanal in Berührung kommt, zu erforschen. Das Verfahren bei den Versuchen war folgendes: in einem sterilen Probirglas wurden 5—10 ccm. des zu untersuchenden Saftes mit Formose vermengt (gewöhnlich in einem Verhältniss von 1 : 5); bisweilen wurde zur grösseren Sicherheit der Aseptik eine geringe Menge Chloroform zugefügt; das genannte Gemisch wurde alsdann bei einer Temperatur von 37° gehalten. Nach einer gewissen Zeit wurde das Probirglas aus dem Thermostaten herausgenommen und der Inhalt bis zum Kochen erhitzt, darauf das Eiweiss entweder durch Hinzufügen von verdünnter Essigsäure und Erhitzen oder einer 5%igen Lösung von Metaphosphorsäure niedergeschlagen. Aus einem Theil des vom Eiweiss befreiten Filtrats wurden Osazone erhalten, der andere Theil diente zur Bestimmung der optischen Eigenschaften und des Verhaltens zu Hefe. (Siehe Tabelle 6.)

Diese Versuche zeigen, dass die Formose durch die Einwirkung der Verdauungsfermente nicht verändert wird und folglich in unverändertem Zustande als solche aus dem Darmcanal resorbirt wird.

Das Resultat aller, von mir hinsichtlich der Formose angestellten, Versuche ist daher folgendes:

1. Nach Injection derselben in die v. jugularis des Kaninchen erscheint von der gesammten eingeführten Menge im Mittel ca. 71,5% im Harn in unverändertem Zustande (conf. Tabelle 1).

2. Die Einführung derselben in die v. mesenterica bei gefütterten Kaninchen ruft eine zeitweilige Glycosurie hervor. Die Menge der dabei im Harn gefundenen Glycose entspricht der Menge der eingeführten Formose. Bei hungernden Kaninchen ruft die Formose unter gleichen Bedingungen keine Glycosurie hervor, im Harn erscheint die unveränderte Formose in einer Menge von ca. 11% der eingeführten.

3) Bei Einführung der Formose in den Magen der Kaninchen erscheint dieselbe im Harn in unverändertem Zustande, wobei bei gefütterten Kaninchen 15,7% der eingeführten

Menge im Harn ausgeschieden wurde, bei hungernden ca. 6,9%.

4. Die Formose kann als Material für die Bildung und Anhäufung des Glycogens in der Leber dienen.

5. Die Verdauungsfermente verändern die Formose nicht.

6. Formose kann im Organismus vermittelt des Glycogens in Glycose übergehen.

Ebensolche Versuche, wie mit der Formose, wurden auch mit der Methose angestellt, welche 1889 von Loew¹⁾ künstlich erhalten und beschrieben worden ist. Sie wurde den Angaben Loew's entsprechend folgendermassen dargestellt: in einem geräumigen Kolben wurden 4 Liter Wasser, 0,5 g gebrannte Magnesia, 2,0—3,0 g schwefelsaure Magnesia, 350,0 bis 400,0 g körniges Blei und 40 ccm. 40%iges Formaldehyd vermischt. Das gesammte Gemisch wurde auf einem Wasserbade bei einer Temperatur von 60° solange erwärmt, bis eine entnommene Probe beim Kochen keinen Geruch von Formaldehyd gab. Dazu waren im Mittel 12—14 Stunden erforderlich. Alsdann wurde die Lösung filtrirt und auf einem Wasserbade bei 50° bis zur Syrupconsistenz eingedampft. Der erhaltene Syrup wurde mit 80%igem Alkohol vermennt und gekocht. Zur abgekühlten Lösung wurde alsdann Aether zugesetzt, der dabei ausfallende Niederschlag abfiltrirt. Das Filtrat wurde von Neuem mit Aether und Ligroin verdünnt, der Niederschlag abfiltrirt. Zum Filtrat wurde nach Entfernung des Aethers absoluter Alkohol und Aether zugesetzt, worauf die Lösung von Neuem filtrirt wurde. Das erhaltene Filtrat wurde nach Entfernung des Aethers mit Wasser versetzt und bis zur Syrupconsistenz eingedampft. Dieser Syrup wurde im Exsiccator bis zum constanten Gewicht getrocknet.

Der erhaltene Syrup war von schwach gelber Farbe, hatte einen sehr süssen Geschmack und reducirte stark eine alkalische Lösung von Kupferoxyd. Bei Erwärmung mit Aetzalkalien gab er eine gelb-braune Färbung; beim Kochen mit HCl bildete sich ein gummiartiger Niederschlag. Mit Hefe

1) B. B. 22. 1889 1—475.

gährte er. Im Destillat der gegohrenen Flüssigkeit konnte die Anwesenheit von Aethylalkohol durch die Jodoformprobe nachgewiesen werden. Bei Einwirkung von Phenylhydrazin wurde krystallinisches Osazon von gelber Farbe mit dem Schmelzpunkt 205—206° erhalten. Die Eigenschaften desselben sind denen des Glycosazons gleich. Auf polarisirtes Licht wirkt Methose nicht. Ihre Zusammensetzung wird durch die Formel $C_6H_{12}O_6$ ausgedrückt; die Formel des Osazons ist $= C_{18}H_{22}N_4O_4$.

Zu meinen Versuchen bereitete ich eine Lösung von Methose von solcher Concentration, dass ihr Procentgehalt nach Bestimmung durch Titriren mittelst Fehling'scher Lösung 9,8% Glycose entsprach.

Die Versuche wurden in derselben Weise wie mit der Formose angestellt. (Siehe Tabelle 7, 8, 9 u. 10.)

Tabelle 7.

Versuche betreffend die Einführung der Methose in die v. jugularis und v. mesenterica.

Nummer	Gewicht des Kaninchens	Menge der eingeführten Methose	Menge der Flüssigkeit	Dauer der Einführung	Benennung der Vene	Menge des Zuckers im Harn	Schmelzpunkt der Osazone	Verhalten zu Hefe	Verhalten im polaris. Licht	Charakter des Zuckers	Anmerkung
1	1720	1,0	10	10'	v. mes.	0,82	205°	gährte	activ	Glycose	
2 (1)	1720	1,0	10	10'	v. jug.	0,61	205°	„	inactiv	Methose	
3	1680	0,5	5	10'	v. mes.	0,42	205°	„	activ	Glycose	
4 (3)	1680	1,0	5	10'	v. jug.	0,58	205°	„	inactiv	Methose	
5	2134	1,0	10	10'	v. mes.	0,12	205°	„	„	„	{ Das Kaninchen hat vor dem Versuch 3 Tage gehungert
6 (5)	2134	1,0	10	10'	v. jug.	0,62	205°	„	„	„	

Aus den angeführten Versuchen resultirt, dass in qualitativer Hinsicht das Verhalten der Methose im Organismus dasselbe ist wie das der Formose. Die Unterschiede betreffen bloss die quantitative Seite der Erscheinung. Die bei der Vergleichung der angeführten Tabellen sich ergebenden Unterschiede werden weiter unten bei den allgemeinen Schlussfolgerungen erörtert werden.

Tabelle 8.

Versuche betreffend die Einführung der Methose in den Magen.

Nummer	Gewicht des Kaninchens	Menge der eingeführten Methose	Menge der Flüssigkeit	Menge des Zuckers im Harn	Schmelzpunkt der Osazone	Verhalten zu Hefe	Verhalten zum polaris. Licht	Charakter des Zuckers	Anmerkungen
1	1412	1,0	10ccm.	0	—	—	—	—	
2	1318	1,0	10 „	0	—	—	—	—	
3(1)	1412	2,0	10 „	0,12	205°	gährte	inactiv	Methose	
4	1618	2,0	10 „	0,15	205°	„	„	„	
5(4)	1618	3,0	10 „	0,26	205°	„	„	„	
6	1820	3,0	10 „	0,24	205°	„	„	„	
7	1680	4,0	15 „	0,48	205°	„	„	„	
8(2)	1318	3,0	10 „	0,24	205°	„	„	„	
9	1642	2,0	15 „	0	—	—	—	—	
10	1589	4,0	20 „	0,22	205°	gährte	inactiv	Methose	{ Die Kaninchen hatten vorher 3 Tage gehung.

Tabelle 9.

Versuche betreffend die Bildung des Glycogens in der Leber nach Fütterung mit Methose.

Nummer	Gewicht vor dem Hungern	Gewicht nach dem Hungern	Dauer des Hungern	Menge der eingeführten Methose	Menge der Flüssigkeit	Nach welcher Zeit das Thier getödt. wurde	Gewicht der Leber	Menge des Glycogens	Anmerkungen
1	1662	1421	4 1/2 Tage	12 g	60 ccm.	12 Stund.	48	0,642	
2	1968	1682	4 1/2 „	12 g	60 „	12 „	52	0,824	
(Kontr.) 3	1912	1648	4 1/2 „	—	—	—	52	0	Die Versuche sind nach der Methode Salomon's ausgeführt word.

Schliesslich sind von mir noch Versuche mit dem künstlich erhaltenen Aether der natürlichen Glycose — dem β -Methylglycosid $C_6H_{11}[CH_3]O_6$ angestellt worden. Dasselbe ist zuerst im Jahre 1893 von E. Fischer¹⁾ durch Einwirkung

1) B. B. 1893. 3407.

Tabelle 10.

Versuche betreffend das Verhalten der Methose zu den Verdauungssäften.

Be- nennung des Saftes	Nr.	Menge der Methose	Menge des Ver- dauungs- saftes	Aufent- haltszeit im Thermost.	Verhalten zum polarisirt. Licht	Verhalten zu Hefe	Schmelz- punkt der Osazone	Charakter des Zuckers
Speichel	1	1 g	5 ccm.	12 Stunden	inactiv	Gährung	205°	Methose
„	2	1 „	5 „	10 „	„	„	„	„
„	3	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	4	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
Magensaft	5	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	6	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	7	2 „	10 „	10 „	„	„	„	„
„	8	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	9	2 „	10 „	6 „	„	„	„	„
Pancrassaft	10	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	11	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	12	1 „	5 „	10 „	„	„	„	„
„	13	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	14	2 „	10 „	12 „	„	„	„	„
„	15	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
Darmsaft	16	1 „	5 „	12 „	„	„	„	„
„	17	1 „	5 „	6 „	„	„	„	„
„	18	1 „	5 „	10 „	„	„	„	„

von Methylalkohol auf Glycose bei Gegenwart von HCl erhalten worden. Es wurde von mir, den Angaben E. Fischer's entsprechend, folgendermaassen dargestellt: auf 1 Gewichtstheil Glycose wurden 4 Gewichtstheile chemisch reinen, 0,25% HCl enthaltenden Methylalkohols genommen. Dieses Gemisch wird in einem Kolben am Rückflusskühler so lange auf einem kochenden Wasserbade gehalten, bis die gesammte Glycose in Lösung übergegangen ist, alsdann wird die abfiltrirte Lösung in hermetisch verschlossenen Gefässen im Verlauf von 50 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Darauf wird nach der Abkühlung der Inhalt des Autoclaven in eine Schale ge-

bracht und bis $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eingedampft. Nach der Abkühlung fallen auf dem Boden und den Wänden der Schale Krystalle des Methylglycosides in Gestalt weisser Flocken aus. Die von der Mutterlauge abfiltrirten Krystalle werden zunächst aus absolutem Alkohol und darauf mehrere Male aus Wasser umkrystallisirt; alsdann zunächst auf dem Filter, hierauf im Exsiccator bis zum constanten Gewicht getrocknet. — β -Methylglycosid reducirt alkalische Kupferoxydlösung sehr schwach und nur nach längerem Kochen; es giebt kein Osazon; es dreht die Polarisationsebene nach rechts, die Spec.-Drehung beträgt $+157,6$; beim Kochen mit 5%iger H_2SO_4 oder HCl zersetzt es sich; es gährt mit Hefe, jedoch sehr schwach.

Die Versuche mit Methylglycosid wurden in derselben Richtung angestellt, wie die mit Formose und Methose. Zu den ersten Versuchen bediente ich mich des β -Methylglycosids, welches von Prof. E. Fischer freundlichst an Prof. Nencki gesandt worden war. Für die folgenden Versuche bereitete ich es mir selber. Der Zuckergehalt wurde mit Hülfe des Polarisationsapparates bestimmt, wo es jedoch möglich war, auch durch Titriren mit Fehling'scher Lösung, wobei die auf diese und jene Weise erhaltenen Resultate die gleichen waren.

Tabelle 11.

Versuche, betreffend die Einführung des Methylglycosids in die v. jugularis und die v. mesenterica bei Kaninchen.

Nummer	Gewicht des Kaninchens	Menge des eingef. Methylglycosids	Menge der eingeführten Flüssigkeit	Dauer der Einführung	Benennung der Vene	Zuckermenge im Harn	Schmelzpunkt der Osazone	Verhalten zum polaris. Licht	Verhalten zu Hefe	Charakter des Zuckers
1	1675	1,5 g	10ccm.	10'	v. mes.	0,25	205°	—	—	Glycose
2	2240	1,5 „	10 „	10'	v. jug.	0,42	kein Osaz.	+ 1°	—	Methylglycosid
3 (1)	1675	1,5 „	10 „	10'	„	0,42	„	+ 1,33°	—	„
4 (2)	—	1,5 „	10 „	10'	v. mes.	0,22	205°	—	—	Glycose
5	1642	1,0 „	10 „	10'	„	0,10	205°	—	—	„
6	1420	1,0 „	10 „	10'	„	0,15	205°	—	—	„
7 (5)	—	1,0 „	10 „	10'	v. jug.	0,24	kein Osaz.	+ 1,66°	—	Methylglycosid

Nummer	Gewicht des Kaninchens	Menge des eingef. Methylglycosids	Menge der eingeführten Flüssigkeit	Dauer der Einführung	Benennung der Vene	Zuckermenge im Harn	Schmelzpunkt der Osazone	Verhalten zum polaris. Licht	Verhalten zu Hefe	Charakter des Zuckers
8 (6)	—	1,0 »	10 »	10'	»	0,24	—	—	—	»
9	2320	0,5 »	5 »	10'	v. mes.	0,10	205°	—	—	Glycose
10	1790	0,5 »	5 »	10'	»	0,12	205°	—	—	»
11 (9)	—	1,0 »	10 »	10'	v. jug.	0,18	kein Osaz.	—	—	Methylglycosid
12 (10)	—	0,5 »	5 »	10'	»	0,06	—	—	—	»
13	1580	1,0 »	10 »	10'	v. mes.	0	—	—	—	Die Kaninchen hatten im Verlauf von 3 Tagen gehungert
14	1640	1,0 »	10 »	10'	»	0	—	—	—	

Tabelle 12.

Versuche betreffend die Einführung des Methylglycosids in den Magen.

Nummer des Kaninchens	Gewicht	Menge des eingef. Methylglycos.	Menge der eingeführten Flüssigkeit	Menge des ausgeschied. Zuckers	Osazone	Gärung	Verhalten zum polaris. Licht	Anmerkung
1	1224	1,0 g	10ccm.	0	—	—	—	
2	1425	2,0 »	10 »	0	—	—	—	
3	1418	3,0 »	20 »	0,12	kein Osazon	gährt	+0,13°	Keine Reaction mit Fehling'scher Lösung
4 (3)	1418	4,0 »	20 »	0,32	»	»	+2,0°	
5	1640	3,0 »	15 »	0,14	»	»	+0,17°	
6	2397	3,0 »	15 »	0,1	»	»	+0,09°	
7 (6)	2347	2,0 »	10 »	0	—	—	—	
8	1378	4,0 »	20 »	0,42	kein Osazon	gährt	+2,25°	keine Reaction mit Fehling'scher Lös.
9	1648	3,0 »	15 »	0	—	—	—	
10	1542	4,0 »	20 »	0,12	kein Osazon	gährt	+0,09°	keine Reaction mit Fehling'scher Lös.

Die Kaninchen hatten 2 Tage gehungert

Tabelle 13.

Versuche betreffend die Glycogenbildung in der Leber nach Fütterung mit Methylglycosid.

Numerus des Kaninchens	Zeit des Hungerns	Gewicht vor dem Hungern	Gewicht nach dem Hungern	Gewichtsverlust	Anzahl der Hungertage	Menge des eingegebenen Methylglycosids	Menge der eingegeführten Flüssigkeit	Tag der Eingabe	Wie viel Stunden das Tier gefüttert wurde	Gewicht der Leber	Menge des Glycogens	Verfahren
1	2.2-3.2	2340	2004	336	6 1/2	12,0	60,0	8. 2.	12	36,0	0,284	nach Kils
2	8.2-12.2	1224	1011	213	4 1/2	12,0	60,0	10.2., 11.2., 12.2.	12	30,0	0,321	n. Salomon

Tabelle 14.

Verhalten des Methylglycosids zu den Verdauungssäften.

Verdauungssaft	Nr.	Menge des Verdauungssaftes	Menge des Methylglycosids	Osazone	Verhalten zu polarisiertem Licht	Verhalten zu Hefe	Verhalten zu Fehling'scher Lösung	Aufenthaltszeit im Thermost.
Speichel	1	5	1,0	kein Osazon	Rechtsdrehung	schw. Gärung	reducirt nicht	6
	2	10	2,0	„	„	„	„	10
	3	5	1,0	„	„	„	„	12
	4	5	1,0	„	„	„	„	6
Magen-saft	1	10	2,0	„	„	„	„	10
	2	5	1,0	„	„	„	„	12
	3	10	2,0	„	„	„	„	10
	4	5	1,0	„	„	„	„	6
	5	10	2,0	„	„	„	„	6
	6	10	2,0	„	„	„	„	12
Pancr-eas-saft	1	10	2,0	„	„	„	„	6
	2	5	1,0	„	„	„	„	10
	3	10	2,0	„	„	„	„	12
	4	5	1,0	„	„	„	„	12
	5	10	2,0	„	„	„	„	6
	6	10	1,0	„	„	„	„	10
Darm-saft	7	5	1,0	„	„	„	„	12
	1	5	1,0	„	„	„	„	10
	2	2,5	0,5	„	„	„	„	6
	3	5	1,0	„	„	„	„	12
	4	5	1,0	„	„	„	„	12

Auch hier sind die von mir beobachteten Erscheinungen in qualitativer Hinsicht dieselben wie bei den Versuchen mit Formose und Methose; es sind nur quantitative Unterschiede vorhanden.

Die folgende Tabelle, welche nur eine relative Bedeutung hat, stellt diese quantitativen Unterschiede anschaulich dar.

Der im Harn gefundene Procentsatz des eingeführten Zuckers.

	d-Glycose (Schöpfer)	Formose	Methose	Methyl- glycosid
Bei Einführ. in d. v. jugul.	73,3 %	71,5 %	60,3 %	24,9 %
» » » » mesent. hung.		11 %	12 %	0
» » » » » gefütt.	0	102 %*	82,6 %*	15,6 %*
» » » d. Magen hung.		15,7 %	7,8 %	4,7 %
» » » » » gefütt.		6,9 %	3,7 %	0

Alle von mir untersuchten Substanzen erwiesen sich geeignet, als Material für die Glycogenablagerung in der Leber zu dienen.

Die Befunde hinsichtlich des Schicksals der von mir eingeführten Substanzen weisen sowohl in qualitativer als in quantitativer Hinsicht darauf hin, dass bei Einführung der Substanzen in die v. jugularis der geringste Procentsatz bei Einführung des β -Methylglycosids im Harn erscheint; letzteres verbrennt folglich im Organismus viel rascher nicht nur als Formose und Methose, sondern auch als d-Glycose. Es ist möglich, dass diese leichtere Verbrennbarkeit bedingt ist durch die Anwesenheit der Methylgruppe, welche selber leichter oxydirt wird und dadurch zu einer schnelleren Oxydierung und folglich auch Verbrennung der Kohlehydratgruppe führt. Wir wissen z. B., dass die Verbindung einer so leicht verbrennbaren Substanz, wie es die Glycuronsäure ist, mit aromatischen Abkömmlingen, erstere vor der Oxydierung schützt und ihr Auftreten im Harn in Form von gepaarten Verbindungen möglich macht; in dem vorliegenden Fall könnte das umgekehrte Verhalten vorliegen d. h. eine leichtere Oxydierbarkeit einer Substanz in Folge der Vereinigung mit der Methylgruppe. In dieser Hinsicht wäre es interessant, Methylab-

*) Charakter des Zuckers: d-Glycose.

kömmlinge der Methose und Formose zu erhalten und ihr Verhalten im Organismus zu verfolgen. Diese leichtere Oxydierbarkeit des β -Methylglycosids offenbart sich auch bei allen anderen Arten der Einführung; bei der Einführung in die v. mesenterica oder den Magen hungernder Kaninchen war im Harn kein Zucker vorhanden, bei Einführung in den Magen satter Kaninchen war der Procentsatz desselben im Harn ein sehr unbedeutender. Die Methose wird, wie es den Anschein hat, auch leichter oxydirt als Formose und Glycose. Eine besondere Beachtung verdient das Auftreten von Glycosurie nach Einführung der untersuchten Substanzen in die v. mesenterica bei satten Kaninchen. Ich enthalte mich davon, eine bestimmte Erklärung dieser Erscheinung zu geben, und kann nur Vermuthungen aussprechen. Ich denke mir, dass diese Erscheinung am leichtesten durch besondere Reize erklärt werden könnte, welche die eingeführten Substanzen auf das Leberparenchym ausüben, Reize, welche einen verstärkten und sofortigen Uebergang des in der Leber abgelagerten Glycogens in Zucker bedingen. Von diesem Gesichtspunkt aus wäre die beobachtete Glycosurie das Resultat einer Glykämie. Die Abwesenheit der Glycosurie nach Fütterungen mit diesen Substanzen könnte dahin erklärt werden, dass im letzteren Fall die eingeführte Substanz allmählich in das Pfortadersystem gelangt und folglich die Concentration derselben in dem die Leber durchströmenden Blute eine viel geringere ist als bei der direkten Injection in die v. mesenterica; damit ist es aber auch verständlich, dass der Reiz selber dermaassen schwach sein kann, dass er sich nicht in einer Glycosurie offenbart. Zu Gunsten der angeführten Erklärungen sprechen auch That-sachen, welche bei der Section der Kaninchen erhoben wurden. Nach der Fütterung hungernder Kaninchen mit Formose erscheint die Leber bei der Section dunkelgefärbt und stark hyperämisch; der wässrige Extract aus einer derartigen Leber ist entgegengesetzt dem gewöhnlichen Verhalten zäh und filtrirt schlecht, mit anderen Worten, die Leber erscheint in gewissem Grade pathologisch verändert; wie wir aber gesehen haben, wird nach Einführung von Formose die Glycosurie am stärksten

beobachtet. Die Abwesenheit der letzteren nach Injection der Substanzen in die v. mesenterica hungernder Kaninchen würde von diesem Gesichtspunkt aus ihre Erklärung in der Abwesenheit von Glycogen in der Leber finden. — Die verhältnissmässig unbedeutende Menge der untersuchten Substanzen, welche im Harn nach Fütterung satter und hungernder Kaninchen gefunden wurde, stellt den Rest dar, welcher nicht Zeit hatte, weder zu verbrennen noch in der Leber in Form von Glycogen abgelagert zu werden. Aus der in der vergleichenden Tabelle angeführten Zahlen, welche den Procentsatz der im Harn auftretenden Substanz nach Einführung derselben in die v. jugularis zeigen, ersehen wir, dass diejenige Substanz, welche im Harn in geringerer Menge auftritt, d. h. besser verbrennt, auch in geringerer Menge nach Fütterung satter oder hungernder Kaninchen auftritt; das β -Methylglycosid z. B. tritt nach Verfütterung desselben an hungernde Kaninchen im Harn gar nicht auf.

Meine Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen; ich setze das Studium über das Schicksal auch anderer künstlich dargestellter Zuckerstoffe im Organismus fort. Auf Grund des bereits vorhandenen Materials glaube ich, dass, je weiter die zu untersuchende Substanz von den natürlichen Hexosen steht, dieselbe um so weniger vom Organismus utilisirt wird, welcher hauptsächlich für die Verarbeitung desjenigen Materials angepasst ist, das er mit der Nahrung erhält. Dass auch die Thierspecies hier von wesentlicher Bedeutung ist, geht aus den Versuchen von Ebstein, Salkowski und Cremer¹⁾ mit den Pentosen hervor. In den Versuchen von Ebstein am Menschen war Xylose schon nach Einverleibung von 0,05 g im Harne nachweisbar, während Xylose und Arabinose in beträchtlichem Grade von Kaninchen utilisirt und zur Glycogenbildung verwendet werden. Aehnliche Beobachtung machte ich mit Formose bei Hunden und Kaninchen.

¹⁾ vgl. Maly's Jahreshb. für 1892, 51, u. 1893, 345.

Ueber den Einfluss der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel bei Hunden.

Von

S. Salaskin und J. Zaleski.

Mit zwei Tafeln.

(Aus der chemischen und physiologischen Abtheilung des Instituts für experimentelle
Medicin in St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 19. Mai 1900.)

Bei der Inangriffnahme vorliegender Arbeit suchten wir das Leben der Hunde nach Entfernung der Leber eine möglichst lange Zeit zu erhalten. Sollte uns dies gelingen, so würde die Möglichkeit gegeben sein, einerseits die Betheiligung der Leber an der Bildung des Harnstoffs festzustellen, andererseits die Abweichungen im allgemeinen Stoffwechsel, welche als Folge des vollkommenen Schwundes der Leber auftreten, klar zu legen. Diese Aufgabe erschien uns nicht unerreichbar. Einige der Gänse von Minkowski lebten nach Entfernung der Leber bis 20 Stunden.¹⁾ Der bei den Gänsen vorhandene natürliche collaterale Abfluss des Pfortaderblutes wird bei Hunden durch die Anlegung einer Eck'schen Fistel — eine Operation, die an und für sich gut ertragen wird — ersetzt. Bereits in der ersten, die Anlegung der Eck'schen Fistel betreffenden Arbeit, welche in unseren Laboratorien von Nencki, Pawlow, Hahn und Massen²⁾ ausgeführt worden war, waren Versuche angestellt worden, bei denen die Fistel

¹⁾ Minkowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1886, Bd. 21, S. 41.

²⁾ Hahn, Massen, Nencki, Pawlow, Arch. des sciences biolog. St-Petersbourg, 1892, T. I, p. 401—497.

entweder von einer Unterbindung der art. hepatica oder einer Leberexstirpation begleitet worden war, im letzteren Falle überlebten die Hunde die Operation 2—3 Stunden, in den günstigsten Fällen sogar 6 Stunden. In der folgenden von Nencki und Pawlow¹⁾ ausgeführten Arbeit wird unter Anderem über zwei Versuche berichtet, in denen die Eck'sche Fistel von einer Exstirpation der Leber gefolgt war. Die Hunde, welche vor der Operation reichlich Fleisch erhalten hatten, überlebten die Operation $3\frac{1}{4}$ resp. $4\frac{1}{2}$ Stunden. Wir können uns keinesfalls mit der Meinung einiger Autoren einverstanden erklären, dass nach Entfernung der Leber sofort der Tod des Thieres beginnt und dass es nicht möglich ist, die Erscheinungen der Agonie von den durch die Ausscheidung der Functionen der Leber bedingten zu trennen. Es genügt, auf den Versuch 2 der oben citirten Arbeit hinzuweisen, wo der Hund nach der Operation im Verlauf von $1\frac{1}{2}$ Stunde sich so weit wohl fühlte, dass er sogar herumging. Der Tod, welcher auf die Exstirpation der Leber folgt, ist demnach nicht die Folge eines grossen Trauma, sondern das Resultat einer Störung der normalen chemischen Umsetzungen. Die Voraussetzung war daher ganz natürlich, dass durch Herabsetzung des Stoffwechsels des einer Operation zu unterziehenden Thieres dessen Leben verlängert werden kann; die Klarlegung des Charakters der in den chemischen Umwandlungen hervorgerufenen Störung konnte Handhabe für Massregeln geben, welche den Zweck hätten, den Einfluss der Störungen in gewissem Maasse zu paralysiren. Wie aus den Versuchen ersichtlich sein wird, haben dieselben die Richtigkeit unserer Folgerungen bestätigt und der Hoffnung Raum gegeben, dass bei weiterer Ausarbeitung der Methode es möglich sein wird, die Hunde nach totaler Leberexstirpation noch längere Zeit hindurch am Leben zu erhalten. Wir zweifeln jetzt durchaus nicht an der Verwirklichung dieser Hoffnung und halten dieselbe nur für eine Frage der Zeit und der Beharrlichkeit. Da wir, wie oben erwähnt, eine grosse Bedeutung der Herabsetzung

¹⁾ Nencki, Pawlow, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 38, S. 215.

des Stoffwechsels beilegen, so bedienten wir uns zur Operation solcher Hunde, welche eine längere Zeit gehungert hatten. Die Dauer des Hungerns schwankte zwischen 3 und 11 Tagen.

Die Operationen wurden unter einer gemischten Morphin- und Chloroformnarkose vorgenommen. Die Narkose wurde, ungeachtet des langen Hungerns, von den Hunden gut ertragen. Der erste durch die Bauchwandungen geführte Schnitt war, wie bei Anlegung einer Eck'schen Fistel, ein Längsschnitt längs dem äusseren Rande m. recti abdominis, angefangen von den Rippen nach unten hin; derselbe wurde hier möglichst lang angelegt. Darauf wurde der zweite Schnitt ausgeführt vom oberen Ende des ersten unterhalb der unteren Ränder der linken Rippen. Auf diese Weise wird die Bauchhöhle breit eröffnet, was sehr wichtig für die Exstirpation der Leber ist. Nach Ausführung der Schnitte wurde in gewöhnlicher Weise eine Eck'sche Fistel angelegt, was unter diesen Bedingungen durchaus einfach ist. Nach Anlegung der Fistel und Unterbindung der v. portae an der gewöhnlichen Stelle wurde zur Entfernung der Leber geschritten, vermittelt Abpressung ihrer Lappen durch feste Ligaturen. Der Leberstumpf wurde nach Möglichkeit mit den Fingern zerdrückt. Darauf wurde eine Harnblasenfistel angelegt, in welche ein Glasrohr mit an beiden Enden abgebogenen Rändern eingebunden wurde, auf letzteres wurde ein Gummischlauch mit einem Quetschhahn aufgezogen. Der gesammte Harn wurde alsdann aus der Harnblase ausgepresst. Die Bauchwunde wurde in gewohnter Weise vernäht, durch diese Wunde wurde auch das in die Harnblase eingesetzte Glasrohr nach aussen geführt. Nach Beendigung der Operation wurden die Hunde in ein besonderes Zimmer gebracht, das vorher auf 20—22° R. erwärmt worden war, auf einen Tisch gelegt und die ganze Zeit über mit gewärmten Decken bedeckt. Die operirten und auf diese Weise gelagerten Hunde wurden verhindert, sich aufzurichten oder zu bewegen, um nach Möglichkeit eine nachfolgende Blutung aus dem Leberstumpf zu vermeiden. Um die Harnabsonderung zu verstärken und auf diese Weise die Entfernung der Stoffwechselprodukte aus dem Organismus zu fördern, führten wir in einigen Fällen den

Hunden physiologische Kochsalzlösung ein, in einem Falle Harnstofflösung und in den letzten Versuchen Sodalösung. Die Flüssigkeit wurde entweder in den Mastdarm oder ins Blut oder subcutan eingeführt. Am zweckmässigsten erwies sich die subcutane Injection von Soda. Gleichfalls zwecks Verstärkung der Harnabsonderung wurde den Hunden eine Stunde vor der Operation Wasser in den Magen eingegossen, in den letzten Versuchen Sodalösung. Die Anwendung von Soda, deren wir uns zum Schluss unserer Versuche bedienten, hatte den Zweck, nicht nur die Harnabsonderung zu verstärken, sondern auch die sauren Produkte zu neutralisiren, welche sich nach der Leberexstirpation im Organismus anhäufen. Die Begründung dieses wird weiter unten gegeben werden.

Der Zustand der Hunde nach der Operation wurde die ganze Zeit über beobachtet. Es wurde die Reaction auf äussere Eindrücke registriert, es wurde der Puls und die Athmung gezählt. In zwei Fällen wurde der Blutdruck gemessen. Alle $1\frac{1}{2}$ Stunden wurde der Harn entleert, seine Reaction, seine Menge und sein Aussehen bestimmt. Vor dem Tode wurde ein Aderlass vorgenommen, darauf die Section gemacht, wobei das Augenmerk hauptsächlich auf die Grösse der Fistelöffnung, die Blutmenge in der Bauchhöhle, den Zustand des Leberstumpfes gerichtet wurde; letzterer wurde ausgeschnitten und gewogen, desgleichen wurden nach sorgfältigem Abpräpariren auch die Theile des Lebergewebes gewogen, die hinter der Ligatur nachgeblieben waren. Da das Lebergewebe des Stumpfes bei der Operation stets sorgfältig mit den Fingern zerdrückt wurde und ausserdem durch Ligaturen abgetrennt war, so konnte dasselbe, gerechter Weise, für abgetödtet gehalten werden und sein Gewicht wurde zum Gewicht der bei der Operation entfernten Leber hinzugeschlagen; es konnten in Folge dessen nur die Theile thätig bleiben, welche hinter den Ligaturen gelegen waren. Bei einer derartigen Berechnung verblieb als thätiges Lebergewebe von 4,2% bis 8,7%, im Durchschnitt ca. 6%.

Eine unangenehme und leider in der Mehrzahl der Fälle bei den Sectionen constatirte Complication war die Nach-

blutung aus dem Leberstumpf. In einigen Fällen war die im Bauchraum gefundene Blutmenge eine recht beträchtliche.

Der nach Stunden gesammelte Harn wurde einer quantitativen Untersuchung auf N, Harnstoff und NH_3 unterzogen; soweit es die Menge gestattete, wurde auch eine qualitative Untersuchung vorgenommen. Ausserdem wurden noch das Blut und einige Organe auf den Gehalt an NH_3 untersucht. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl-Gunning bestimmt durch Verbrennung mit einem Gemisch von H_2SO_4 und K_2SO_4 ; NH_3 wurde nach dem Verfahren von Nencki und Zaleski, der Harnstoff nach Schöndorff und in einigen Fällen nach Sjöquist bestimmt. Als Indicator diente beim Titriren ein Gemisch von Lacmoid und Malachitgrün. Schwefelsäure wurde in $\frac{1}{10}$ Normallösungen, KOH in $\frac{1}{40}$ Normallösungen benutzt.

Im Ganzen haben wir 14 Hunde operirt; auf Grund unserer Beobachtungen sind wir zum Schluss gelangt, dass sich für diese Operation am besten die gewöhnlichen grossen Hofhunde eignen. Kleine Hunde, sowie Rassehunde eignen sich wenig dazu.

In den folgenden Protokollen werden die auf jeden operirten Hund im Einzelnen sich beziehenden Befunde angeführt. Vier von den 14 operirten Hunden gingen nach der Operation rasch zu Grunde, in Folge dessen sie in den Protokollen nicht erwähnt werden.

Hier sei noch bemerkt, dass sämtliche Operationen von Prof. Pawlow in seinem Laboratorium ausgeführt worden sind, ausserdem nahmen an der Beurtheilung der Fragen über die Anstellung der Versuche und der chemischen Untersuchung stets Prof. Nencki und Prof. Pawlow theil, so dass vorliegende Arbeit das Resultat einer collectiven Thätigkeit der physiologischen und chemischen Abtheilungen des Instituts für experimentelle Medicin darstellt.

Protokolle.

Hund Nr. 1.

D. 27. I. 98. Einer Hündin von 14,43 kg Gewicht wurde am siebenten Tage vollständigen Hungerns die Eck'sche Fistel

mit der darauffolgenden Exstirpation der Leber angelegt. Die Exstirpation wurde um 12 Uhr 50 Min. beendet. Gleich nach der Entfernung der Leber wurde der Harn aus der Harnblase ausgepresst. Quantität desselben = 25,5 ccm.; Reaction schwach sauer, sein Aussehen leicht trübe. Der Hund, nachdem er sich etwas von der Operation erholt, fängt an, äussere Eindrücke zu empfangen, aber nur sehr schwach, überhaupt die ganze Zeit nach der Operation war sein Zustand ein sehr gedrückter. Der Puls war die ganze Zeit ein schneller. In verschiedenen Zwischenräumen und in Portionen von je 50—150 ccm. wurde physiologische Kochsalzlösung eingeführt. Unter dem Einflusse der ersten Injectionen wurde der Puls etwas besser. Um 3 Uhr wurden aus der Harnblase 12 ccm. trüben Harns entleert. Reaction schwach alkalisch. Im Harn Spuren von Blut und Gallenfarbstoff. Am Ende der 4. Stunde leichte krampfhaft Zuckungen in den oberen Extremitäten. Ein sehr schneller Puls. Um 4 Uhr 50 Min. vollständiger Aderlass. Bei der Autopsie fanden wir in der Bauchhöhle 450 ccm. Blut. Die Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 282 g. Gewicht des Restes hinter den Ligaturen 21 g. Lebensdauer 3 Std. 45 Min.

Harnanalyse:	Gesammt-N	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Gleich nach der Exstirpation der Leber	4,235%	3,07%
Nach 2 Std. 10 Min.	1,15%	4,43%
In 100 g Gehirn (Reaction alkalisch) NH_3 — 18,45 mg.		

Hund Nr. 2.

3. II. 98. Einem männlichen Hunde, 19,26 kg schwer, wurde am fünften Tage des Hungerns die Eck'sche Fistel angelegt und darauf die Leber exstirpiert. Eine Stunde vor der Operation wurden in den Magen des Hundes mittelst Sonde 700 ccm. Wasser eingeführt. Leberexstirpation um 12 Uhr 10 Min. beendet. Harnblase entleert. Puls normal. Respiration selten.

1. 1 Uhr 10 Min. Der Hund noch unter dem Einflusse der Narkose. Harn 8,5 ccm. Reaction schwach alkalisch.

2. 2 Uhr 10 Min. Der Hund fängt an, sich von der

Narkose zu erholen. Harn 20,5 ccm. Reaction sauer. Puls 72. 10 Athemzüge in der Min.

3. 2 Uhr 40 Min. T. in recto 35,2°. Puls 65. 10 Athemzüge in der Min. 3 Uhr 10 Min. Harn 13,5 ccm. Reaction sauer.

4. 3 Uhr 35 Min. Voller Puls 65. Der Hund ist für äussere Eindrücke empfänglich. 4 Uhr 10 Min. Harn 11,3 ccm. Reaction stark sauer.

5. 5 Uhr. Puls 110. 5 Uhr 10 Min. Harn 9,5 ccm. Reaction stark sauer.

6. 5 Uhr 50 Min. Per rectum 200 ccm. Wasser eingeführt. 6 Uhr 10 Min. Harn 8,5 ccm. Reaction stark sauer. Der Hund empfindet Schmerzen. Puls 170. 6 Uhr 30 Min. Beim Drücken des Schwanzes winselt der Hund. Per rectum 200 ccm. Wasser eingegossen.

7. 7 Uhr 10 Min. Harn 7 ccm. Reaction stark sauer. Puls 168.

8. 7 Uhr 25 Min. Per rectum 200 ccm. Wasser eingeführt. 7 Uhr 40 Min. Harn 4,5 ccm. Reaction stark sauer. 7 Uhr 50 Min. T. in recto 37,5°. 8 Uhr. Allgemeine leichte Kramp fzuckungen. Puls 196. 8 Uhr 10 Min. Unter die Haut 1 ccm. 0,5%ige Digitalinlösung injicirt (5 mg). Der Hund winselt vor Schmerz. Der Puls frequent, schwer zählbar, 208. Per rectum 200 ccm. Wasser. Krämpfe in den Extremitäten. Der Hund stöhnt die ganze Zeit.

9. 8 Uhr 20 Min. Puls 152. Starke Krämpfe (klonische und tonische). 8 Uhr 25 Min. Tod. Lebensdauer 8 Std. 15 Min.

Autopsie. Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 337 g, des Restes hinter den Ligaturen 32 g (7,8%). Wasser eingeführt: In den Magen vor der Operation 700 ccm., per rectum 700 ccm. Der Hund hat Harn abgelassen: 1 Uhr 8,5 ccm.; 2 Uhr 20,5 ccm.; 3 Uhr 13,5 ccm.; 4 Uhr 11,3 ccm.; 5 Uhr 9,5 ccm.; 6 Uhr 8,5 ccm.; 7 Uhr 7,0 ccm.; 8 Uhr 4,5 ccm.; im Ganzen 73,3 ccm. In der ersten Stunde alkalische Reaction, von der zweiten Stunde an Reaction sauer. Von dieser Portion an zeigt sich ein Niederschlag, der in den folgenden Portionen zunimmt.

Harnanalyse:	Gesamt-N	N(U) ⁺	N(NH ₃)	$\frac{N(U)}{N}$	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Vor der Operation	4,37%	2,91%	0,12%	66,5%	2,75%
In der 2., 3. und 4. Stunde	2,49%	1,86%	0,17%	74,7%	6,9%
» » 5. und 6. Stunde	2,29%	1,65%	0,274%	75,52%	12,0%
» » 7. » 8. »	1,36%	0,68%	0,255%	50,0%	18,75%
Im Blut NH ₃ in				100 g	2,75 mg
In Muskeln » »				100 »	18,3 »
Im Gehirn (Reaction schwach, aber deutlich alkalisch)					18,2 »
(Siehe S. 537.)					

Hund Nr. 5.

13. II. 98. Einem männlichen Hunde, von 21,13 kg Gewicht, wurde wie gewöhnlich Eck'sche Fistel nur mit dem Unterschied, dass die v. portae oberhalb der Mündung der v. pancreatico-duodenalis abgebunden war, angelegt.

Wir wollten die Operation in zwei Absätzen ausführen. Das Anlegen der Eck'schen Fistel mit der Abbindung der v. portae oberhalb der Mündung der v. panc.-duod. bringt keine wichtigen Veränderungen im Blutkreislauf der v. portae, d. h. keine bedeutenden Störungen der Function der Leber hervor. Ein auf solche Weise operirter Hund unterscheidet sich kaum vom normalen. Folglich, es blieb abzuwarten, bis sich der Hund von der Operation erholt, um dann die Leber zu exstirpiren. Die Bauchwunde ist zugenäht und der auf diese Weise operirte Hund ist dem Hungern unterworfen. Wasser bekam der Hund ad libitum. Während der ganzen Zeit nach der Operation hatte der Hund starken Durst, die Quantität des täglich getrunkenen Wassers betrug 1—1,5 Liter.

Am 18. II. Leberexstirpation. Gewicht des Hundes 19,5 kg. Vor der Operation wurden 700 ccm. Wasser in den Magen eingeführt. Um 10 Uhr 50 Min. Exstirpation der Leber beendet. Ausser der gewöhnlichen, Fistel des Dünndarmes angelegt.

1. Um 11 Uhr 40 Min. Harn ausgelassen.

2. 12 Uhr. Der Zustand des Hundes ist ein depressirter. Puls 140. Um 12 Uhr 30 Min. Durch die Darmfistel 100 ccm. Wasser eingeführt. Um 12 Uhr 35 Min. Puls 140. Der Zustand ein gedrückter.

3. Um 1 Uhr. 120 ccm. Wasser eingeführt. Um 1 Uhr 27 Min. T. in recto 37°. Um 1 Uhr 30 Min. 110 ccm. Wasser eingeführt. Um 1 Uhr 45 Min. 1,4 ccm. Harn, Reaction sauer.

4. Um 2 Uhr 110 ccm. Wasser eingeführt. T. 37°. 0,4 ccm. Harn, Reaction sauer. Puls 164. Unter die Haut 2,5 mg Digitalin. Um 2 Uhr 10 Min. Schmerzempfindung vorhanden. 2 Uhr 20 Min. 5 mg Digitalin unter die Haut. 2 Uhr 25 Min. Puls 164. Schmerzempfindung vorhanden.

5. 3 Uhr 30 Min. Krämpfe. 3 Uhr 45 Min. Puls 172. Krämpfe dauern fort. 4 Uhr 10 Min. Tod. Lebensdauer 5 Std. 20 Min.

Autopsie: Die Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 502 g. Rest der Leber hinter den Ligaturen 45 g (8,2%). Wasser eingeführt: In den Magen vor der Operation 700 ccm., in den Dünndarm 440 ccm. Harn erhalten 1,8 ccm.

Analyse:

Blut	NH ₃ in 100 g	4,61 mg.
Gehirn	„ „ 100 „	20,38 „
Muskeln	„ „ 100 „	15,52 „

Hund Nr. 6.

Ein männlicher Hund hungert vom 19. II. 98. 23. II. 500 ccm. Wasser in den Magen eingeführt. Am 24. II., folglich am fünften Tage des Hungerns, das Anlegen der Eck'schen Fistel mit darauffolgender Exstirpation der Leber. Gewicht des Hundes 19,8 kg. Zwei Stunden vor der Operation 700 ccm. Wasser in den Magen eingeführt. Leberexstirpation um 11 Uhr 40 Min. beendet. Aller Harn, wie gewöhnlich, aus der Harnblase entfernt. Puls nach der Operation ein voller, 93.

1. 12 Uhr 40 Min. Harn 4,5 ccm. Reaction sauer.

2. 1 Uhr. 200 ccm. Wasser per rectum eingeführt. Puls 76—80. T. in recto 35° C. 1 Uhr 10 Min. Puls 66. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer. 1 Uhr 30 Min. Puls 72. 210 ccm. per rectum. 1 Uhr 40 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer.

3. Per rectum 210 ccm. Wasser. Puls 66—72. 2 Uhr 10 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer. 2 Uhr 40 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer.

4. 3 Uhr 10 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer. 3 Uhr 40 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer. Per rectum 200 ccm. Wasser. T. 35° C. Puls 78.

5. 4 Uhr. Beim Pfeifen erhebt der Hund den Kopf. 4 Uhr 10 Min. Harn 3,5 ccm. Reaction sauer. 4 Uhr 25 Min. per rectum 110 ccm. Wasser. 4 Uhr 40 Min. Harn 5 ccm. Reaction sauer. Puls 136. Komatöser Zustand.

6. 5 Uhr. Puls 150. Respiration 20. 5 Uhr 10 Min. Harn 4,5 ccm. Reaction sauer. 5 Uhr 40 Min. Harn 1,5 ccm. Reaction sauer.

7. 5 Uhr 50 Min. Per rectum 200 ccm. Wasser. 5 Uhr 55 Min. Anfang der Krämpfe. 6 Uhr 25 Min. Harn 1,5 ccm. Reaction sauer. 6 Uhr 30 Min. Puls 180. Krämpfe dauern fort. 6 Uhr 40 Min. per rectum 75 ccm. Wasser. Puls 168.

8. 6 Uhr 55 Min. Schwache Krämpfe. Um 7 Uhr alles Blut ausgelassen.

Bei der Autopsie waren in der Bauchhöhle 185 ccm. Blut. Die Harnblase leer. Gewicht der exstirpierten Leber 315 g. Gewicht des hinter den Ligaturen gebliebenen Restes 32 g (7,6%), vor der Ligatur 73 g. Wasser in den Magen 205 ccm. Lebensdauer 7 Std. 20 Min. Vom Hunde Harn gewonnen: 1 Uhr 4,5 ccm.; 2 Uhr 7 ccm.; 3 Uhr 7 ccm.; 4 Uhr 9 ccm.; 5 Uhr 8,5 ccm.; 6 Uhr 6,0 ccm.; 7 Uhr 1,5 ccm. Im Ganzen 43,5 ccm. saurer Reaction. Die ganze Quantität wurde zur qualitativen Analyse verwandt. (Siehe S. 538.)

Analyse:

Blut	in 100 g	2,6	mg NH ₄
Gehirn	• 100 •	20,96	• •
Muskeln	• 100 •	19,69	• •

Hund Nr. 8.

3. IV. 98. Einem männlichen Hunde, 13,6 kg schwer, wurde am dritten Tage des Hungerns, nach Anlegung der Venenfistel, wie gewöhnlich, Leber exstirpiert. Um 11 Uhr 45 Min. die Leberexstirpation beendet.

1. 12 Uhr 35 Min. Voller Puls 118. 12 Uhr 40 Min. per rectum 200 ccm. Wasser. 12 Uhr 45 Min. Harn 7,2 ccm. Reaction sauer.

2. 12 Uhr 50 Min. Puls 110. Rhythmische epileptische Zuckungen der Hinterkopfmuskeln. 12 Uhr 55 Min. Puls 100. 1 Uhr 5 Min. Puls 96. 1 Uhr 15 Min. Per rectum 200 ccm. Wasser. Puls 90. 1 Uhr 30 Min. Puls 92. 1 Uhr 45 Min. Harn 3,8 ccm. Per rectum 200 ccm. Wasser.

3. 2 Uhr 20 Min. per rectum 215 ccm. Puls 90. 2 Uhr 45 Min. Harn 3 ccm. In die v. femoralis wird langsam 100 ccm. Wasser mit 5 g Harnstoff und 0,7 g NaCl eingeführt.

4. 2 Uhr 53 Min. Puls 84. 3 Uhr 7 Min. Harn 6,0 ccm. 3 Uhr 30 Min. Aeusserst beschwertes Athmen. 3 Uhr 38 Min. Tracheotomie. Künstliche Respiration. 3 Uhr 45 Min. Harn 5,8 ccm.

5. 3 Uhr 50 Min. Krämpfe. Opisthotonus. Puls 48. 4 Uhr. Puls 74. 4 Uhr 12 Min. Harn 4,2 ccm. 4 Uhr 30 Min. Puls 184. Die ganze Zeit Tetanus. Harn 0,6 ccm.

6. 4 Uhr 55 Min. Puls 228. 5 Uhr 30 Min. voller Aderlass.

Bei der Autopsie erwies sich die Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 537 g; Gewicht des Leberrestes vor den Ligaturen 55 g, hinter den Ligaturen 25 g (4,2%). Lebensdauer 5 Std. 45 Min. Harn gelassen: Um 1 Uhr 7,2 ccm.; 2 Uhr 3,8 ccm.; 3 Uhr 3,0 ccm.; 4 Uhr 11,8 ccm.; 5 Uhr 4,8 ccm.; im Ganzen 30,6 ccm. Der Harn wurde zur qualitativen Analyse verwendet. (Siehe S. 539.)

Hund Nr. 9.

Am 16. III. 98 wurde die gleiche Operation an einem Hunde von 20,83 kg Gewicht, am siebenten Tage des Hungerns, ausgeführt. Eine Stunde vor der Operation 700 ccm. Wasser in den Magen eingeführt. Die Leberexstirpation um 11 Uhr 55 Min. beendet.

1. 12 Uhr 55 Min. Harn 13 ccm. Reaction sauer.

2. 1 Uhr. per rectum 150 ccm. Wasser. 1 Uhr 20 Min. Puls 128—136. 1 Uhr 25 Min. Harn 3 ccm. 1 Uhr 30 Min. per rectum 150 ccm. Wasser. Puls 128. Der Hund erhebt den Kopf, Empfindlichkeit vorhanden. 1 Uhr 55 Min. Harn

3 ccm. T. in recto 35,9°. Puls 132. Auf starkes Pfeifen erhebt der Hund den Kopf. Per rectum 150 ccm. Wasser.

3. 2 Uhr 25 Min. Harn 3 ccm. Per rectum 150 ccm. Wasser. 2 Uhr 55 Min. Harn 3 ccm. Reaction sauer.

4. 3 Uhr 25 Min. Harn 2,3 ccm. Reaction sauer. Der Zustand des Hundes ist komatös. Muskelzuckungen. 3 Uhr 55 Min. Harn 1 ccm. 4 Uhr 30 Min. T. in recto 38,7°. Da exitus zu befürchten war, um 4 Uhr 55 Min. voller Aderlass. Lebensdauer 5 Std.

Bei der Autopsie in der Bauchhöhle wurden 105 ccm. Blut gefunden. Harnblase leer. Wasser im Magen 200 ccm., in den Gedärmen 360 ccm. Gewicht der exstirpirten Leber 470 g, Gewicht des Restes vor den Ligaturen 29 g, hinter den Ligaturen 24 g (4,8%). Harn vom Hunde gewonnen: 1 Uhr 13 ccm.; 2 Uhr 6 ccm.; 3 Uhr 6 ccm.; 4 Uhr 3,3 ccm.; im Ganzen 28,3 ccm.

Harnanalyse:	Gesammt-N	N(U) ⁺	N(NH ₃)	$\frac{N(U)}{N}$	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Vor der Operation gew.	4,42%	3,82%	0,158%	86,22%	3,58%
In der 1. Stunde	3,73%	3,26%	0,220%	87,48%	5,9%
„ „ 2. „	4,02%	3,16%	—	78,48%	—
„ „ 3. und 4. Stunde	3,74%	2,75%	0,190%	73,52%	5,09%

Der Harnstoff wurde nach Sjöquist bestimmt.

Blut NH₃ in 100 g 1,98 mg

Gehirn „ „ 100 „ 22,44 „

Muskeln „ „ 100 „ 15,10 „

Hund Nr. 10.

18. III. 98. Ein Hund von 22,92 kg Gewicht wurde am 8. Tage des Hungerns wie in den vorigen Versuchen operiert. Leberexstirpation um 12 Uhr 15 Min. beendet.

1. 12 Uhr 50 Min. Puls 84. 1 Uhr. Harn 9 ccm. 1 Uhr 15 Min. Harn 0,3 ccm. Per rectum 150 ccm. Wasser.

2. 1 Uhr 20 Min. Puls 60. Schmerzgefühl. 1 Uhr 30 Min. per rectum 150 ccm. Wasser. 1 Uhr 45 Min. Harn 6 ccm. 2 Uhr. 80 ccm. der physiologischen Lösung NaCl unter die Haut. Puls 60. 2 Uhr 15 Min. Harn 5,8 ccm.

3. 2 Uhr 30 Min. Puls 60. 2 Uhr 45 Min. Harn 4,6 ccm. Beim Pfeifen erhebt der Hund den Kopf. 2 Uhr 55 Min. 120 ccm. physiologische Kochsalzlösung unter die Haut. 3 Uhr 15 Min. Harn 5,9 ccm. Puls 56.

4. 3 Uhr 55 Min. Harn 7,8 ccm. 4 Uhr 5 Min. 120 ccm. physiologische Kochsalzlösung unter die Haut. 4 Uhr 15 Min. Puls 64. Harn 5,4 ccm.

5. 4 Uhr 45 Min. Harn 5,8 ccm. T. in recto 36. Puls 88. 120 ccm. physiologische Kochsalzlösung unter die Haut. 5 Uhr 15 Min. Harn 4,6 ccm. Puls 121. T. in recto 36,8.

6. 5 Uhr 30 Min. Krämpfe. Puls 154. 5 Uhr 45 Min. Harn 3,8 ccm.

7. 6 Uhr 40 Min. Klonische Krämpfe. Puls 188—200. 7 Uhr. Puls 172. Harn 7,2 ccm. Ungefähr um 7 Uhr hörten die Krämpfe fast gänzlich auf, es verschwand auch die früher gewesene reflectorische „Erregbarkeit“.

8. 7 Uhr 20 Min. Keine Krämpfe. Tiefe Respiration mit zeitweiligen Pausen. T. in recto 37,2. 7 Uhr 35 Min. 80 ccm. physiologische Lösung NaCl unter die Haut. Puls 198. Schmerzgefühl vorhanden. 7 Uhr 40 Min. Tonische Krämpfe in den Muskeln. 8 Uhr 15 Min. Tetanus. Lebensdauer 8 Stunden.

Bei der Autopsie fand man in der Bauchhöhle 350 ccm. Blut. Wasser im Magen 175 ccm. Die Harnblase leer. Gewicht der exstirpierten Leber betrug 492 g, vor den Ligaturen 21 g, hinter denselben 49 g (8,7%). Harn vom Hunde gewonnen: 1. Stunde 9,3 ccm., 2. Stunde 11,8 ccm., 3. Stunde 10,5 ccm., 4. Stunde 13,2 ccm., 5. Stunde 10,4 ccm., 6. Stunde 3,8 ccm., 7. Stunde 7,2 ccm. Im Ganzen 66,2 ccm. Reaction sauer.

Harnanalyse:	Gesamt-N	N(U) ⁺	N(NH ₃)	$\frac{N(U)^+}{N}$	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Vor der Operation gew.	0,957%	0,835%	0,0098%	87,26%	1,02%
In der 4. Stunde	2,78%	—	0,100%	—	3,60%
» » 6. u. 7. Stunde	2,40%	1,738%	0,272%	72,41%	11,37%
Blut	NH ₃ in 100 g	1,63 g			
Gehirn	»	»	13,73 g		

Die Harnstoffbestimmung nach Sjöquist.

Hund Nr. 11.

28. IV. 98. Einem männlichen Hunde von 24,30 kg Gewicht wurde am siebenten Tage des Hungerns, wie üblich, die Operation gemacht. Eine Stunde vor der Operation wurden dem Hunde 700 ccm. Wasser in den Magen eingeführt. Zur Injection unter die Haut ist eine Lösung von 7,5 g NaCl und 2 g gebrannter Soda auf 1000 ccm. Wasser bereitet. Die Leberexstirpation ist um 12 Uhr beendet.

1. 1 Uhr. Puls 72. Harn 2,2 ccm. 40 ccm. Lösung unter die Haut.

2. 1 Uhr 30 Min. Puls 60. Harn 3,2 ccm. 40 ccm. Lösung unter die Haut. Der Hund befindet sich noch unter dem Einflusse der Narkose, er rührt sich von Zeit zu Zeit, als ob er erwachen wolle. 2 Uhr. Respiration 16. Puls 66. T. in recto 34,9. Harn 4 ccm. 40 ccm. der obenerwähnten Lösung unter die Haut.

3. 2 Uhr 30 Min. Athmen 16. Puls 64. T. in recto 34,9. Harn 3,8 ccm. 30 ccm. Lösung unter die Haut. 2 Uhr 45 Min. Der Hund fängt an zu sich zu kommen, er erhebt sich. 3 Uhr. Harn 4,8 ccm. Puls 88. 40 ccm. Lösung unter die Haut.

4. 3 Uhr 30 Min. T. in recto 34,9. Puls 80. Athmen 18. 40 ccm. Lösung unter die Haut. Harn 6 ccm. Der Hund versucht sich zu erheben. 4 Uhr. T. in recto 34,9. Puls 96. Athmen 18. 35 ccm. Lösung unter die Haut. Harn 5,3 ccm.

5. 4 Uhr 30 Min. 40 ccm. Lösung unter die Haut. Harn 6,6 ccm. 5 Uhr. Puls 110. 40 ccm. Lösung unter die Haut. Harn 6 ccm.

6. 5 Uhr 30 Min. T. 35,1. Puls 160. Harn 5 ccm. 40 ccm. Lösung unter die Haut.

7. 6 Uhr 30 Min. Harn 1,4 ccm. Puls 190. 30 ccm. Lösung unter die Haut. Schmerzgefühl fehlt.

8. 7 Uhr 25 Min. Einzelne Zuckungen in den Extremitäten. Reflectorische Erregbarkeit erhöht. 7 Uhr 30 Min. 40 ccm. Lösung unter die Haut. Die Krämpfe werden stärker. Trismus. 8 Uhr anhaltende klonische Krämpfe. 8 Uhr 30 Min. dieselben Erscheinungen. 40 ccm. Lösung unter die Haut.

9. 9 Uhr. Die Krämpfe werden stärker. Reflectorische Erregbarkeit ist sehr stark. 9 Uhr 30 Min. T. 35,9. Tetanus. 9 Uhr 45 Min. In Erwartung des nahen Todes wurde das Thier durch Aderlass verblutet. Lebensdauer 9 St. 45 Min.

Bei der Autopsie fanden sich 320 ccm. Blut in der Bauchhöhle. 450 ccm. Wasser im Magen. Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 494 g. Rest vor den Ligaturen 27 g, hinter denselben 26 g (4,7%). Subcutan wurden im Ganzen 1,25 g. Na_2CO_3 injicirt. Harn vom Hunde gewonnen: 1. Stunde 2,2 ccm., 2. Stunde 7,2 ccm., 3. Stunde 8,6 ccm., 4. Stunde 11,3 ccm., 5. Stunde 12,6 ccm., 6. Stunde 9 ccm., 7. Stunde 1,6 ccm. Im Ganzen 52,5 ccm.

Harnanalyse:	Gesamt-N	$\text{N}(\text{U})$	$\text{N}(\text{NH}_3)$	$\frac{\text{N}(\text{U})}{\text{N}}$	$\frac{\text{N}(\text{NH}_3)}{\text{N}}$
Gewonnen den 25. IV.	2,064%	1,6856%	—	81,66%	—
Vor der Operation	2,581%	2,173%	0,1561%	84,11%	6,05%
In der 1., 2. u. 3. St.	1,505%	0,110%	0,1037%	73,78%	6,89%
» » 4. Stunde	1,791%	1,482%	0,1078%	82,74%	6,02%
» » 5. Stunde	1,546%	1,249%	0,1350%	80,79%	8,73%
» » 6. u. 7. Stunde	1,203%	0,9056%	0,1588%	75,27%	13,20%
Blut	NH_3 in 100 g	1,81 mg			
Gehirn	»	»	18,42 mg.		

Hund Nr. 12.

1. V. 98. Eine Hündin von 27,51 kg Gewicht wurde am 10. Tage des Hungerns, wie in den vorigen Versuchen, operirt. Eine Stunde vor der Operation wurden 500 ccm. Wasser mit 10 g Na_2CO_3 in den Magen eingeführt. Leberexstirpation um 12 Uhr beendet. Zur Injection unter die Haut wird eine Lösung aus 2,2 g gebrannter Soda und 7,5 g NaCl auf 1000 ccm. Wasser bereitet.

1. Puls 78. Unter die Haut 40 ccm. Kochsalzsodalösung. Harn 14,5 ccm. Reaction sauer.

2. 1 Uhr 30 Min. Puls 66. 40 ccm. Kochsalzsodalösung unter die Haut. Harn 4 ccm. Reaction schwach, aber deutlich sauer. T. 34,3. 2 Uhr. Harn 5 ccm. Puls 54. 80 ccm. der Lösung unter die Haut.

3. 2 Uhr 25 Min. Kymographische Bestimmung des Blutdruckes in einem Ast der art. femoralis. Curve Nr. 1. Druck 81 ccm. 2 Uhr 30 Min. Puls 54. 80 ccm. der Lösung unter die Haut. Harn 1,1 ccm. 3 Uhr. Puls 52. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Harn 9,1 ccm. Reaction sauer.

4. 3 Uhr 30 Min. Unter die Haut 40 ccm. der Lösung (Sodagehalt in derselben bis auf 0,5% gebracht). Puls 50. Harn 6 ccm. Der Hund fühlt sich gut, versucht aufzustehen und den Tisch zu verlassen. 3 Uhr 50 Min. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 2. Druck 96,8. 4 Uhr. Harn 6,4 ccm. Reaction alkalisch. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. T. 35,2. Selbstgefühl, wie vorher, gut.

5. 4 Uhr 30 Min. Harn 7,8 ccm. Reaction alkalisch. Puls 50. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Selbstgefühl wie früher. Beim Schlagen mit der Thür erhebt der Hund den Kopf. 5 Uhr. Harn 9,6 ccm. Reaction stark alkalisch. Puls 50. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Selbstgefühl gut.

6. 5 Uhr 30 Min. Harn 11,7 ccm. Reaction stark alkalisch. Puls 50. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. T. 35,8. 5 Uhr 45 Min. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 3. Druck 88. 6 Uhr. Harn 11,4 ccm. Reaction stark alkalisch. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Puls 60. Der Hund fühlt sich so wohl, dass er auf Liebkosung reagirt.

7. 6 Uhr 30 Min. Harn 9,5 ccm. Reaction schwach alkalisch. Puls 66. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. T. 35,8. 6 Uhr 45 Min. Puls 108. 7 Uhr. Harn 7,2 ccm. Puls 90. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Selbstgefühl des Hundes etwas schlechter. Er versucht nicht mehr sich aufzurichten, er erhebt von Zeit zu Zeit den Kopf, senkt ihn aber schnell wieder.

8. 7 Uhr 30 Min. Harn 5 ccm. Reaction schwach sauer. 80 ccm. der Lösung unter die Haut. 8 Uhr. Harn 4,4 ccm. Reaction schwach sauer. 40 ccm. physiologischer Salzlösung unter die Haut. Puls 174. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 4. Druck 100,6.

9. Der Hund wird schwächer, versucht aber doch von Zeit zu Zeit sich auf die Vorderfüsse zu stellen. 8 Uhr 15 Min.

Respiration 16. T. 36,5. 8 Uhr 30 Min. Harn 2,8 ccm. Reaction schwach sauer. Unter die Haut 40 ccm. physiologische Kochsalzlösung. Er hebt selbst den Kopf und hält ihn einige Zeit aufrecht. Während der Injection erhebt der Hund den Kopf und kehrt ihn nach der Seite des Schmerzes, dasselbe thut er, während die Injectionsstelle behufs schneller Resorption gerieben wird. 8 Uhr 50 Min. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 5. Puls 210. Druck 83,6. 9 Uhr. Harn 2 ccm. Reaction schwach sauer. 40 ccm. physiologischer Kochsalzlösung unter die Haut. Bei der Injection unter die Haut erhebt er nicht den Kopf. Erhebt man den Hund aber, so hält er ihn aufrecht und legt ihn sodann vorsichtig auf den Tisch.

10. 9 Uhr 30 Min. Respiration 18. Harn 1 ccm. Reaction schwach sauer. 40 ccm. physiologischer NaCl-Lösung unter die Haut. Der Hund ist noch im Stande, den aufgehobenen Kopf aufrecht zu halten.

11. 10 Uhr 30 Min. Puls 184. 10 Uhr 45 Min. Leichte klonische Zuckungen. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 6. Erregung des N. vagus. 11 Uhr. Bestimmung des Blutdruckes. Curve Nr. 7. Puls 186. Druck 69,6.

12. 11 Uhr 10 Min. Tetanische Krämpfe in den vorderen Extremitäten. Reflectorische Erregbarkeit erhöht. 11 Uhr 15 Min. T. 36,2. 11 Uhr 45 Min. Reflectorische Erregbarkeit sehr bedeutend. Tetanische Krämpfe. Bestimmung des Blutdruckes. Druck 53. Curve Nr. 8. Puls 186.

13. 12 Uhr 15 Min. Tetanus. Bestimmung des Blutdruckes. Erregbarkeit des N. vagus. Curve Nr. 9. 12 Uhr 30 Min. Rare Respiration mit zeitweiligem Anhalten. Tetanische Krämpfe schwächer. Puls 164. 12 Uhr 45 Min. Puls 180—192. Starker Opisthotonus. Tetanus. Häufige oberflächliche Respiration. Um 1 Uhr wird das Blut durch Aderlass entleert. Lebensdauer 13 Stunden.

Bei der Autopsie fanden wir in der Bauchhöhle 500 ccm. Blut. Kein Wasser im Magen. Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 465 g. Rest vor den Ligaturen 22 g, hinter denselben 28 g (5,4%). In den Magen 10 g Na_2CO_3 einge-

führt. Unter die Haut 2,6 g. Harn vom Hunde entnommen: In der 1. Stunde 14,5 ccm., 2. Stunde 9 ccm., Reaction sauer, 3. Stunde 10,2 ccm., Reaction sauer, 4. Stunde 12,4 ccm. (in der ersten halben Stunde schwach sauer, in der zweiten alkalisch), 5. Stunde 17,4 ccm., Reaction sauer, 6. Stunde 23,1 ccm., Reaction sauer, 7. Stunde 16,7 ccm. (in der ersten halben Stunde schwach alkalische Reaction, in der zweiten neutral), 8. Stunde 9,4 ccm., Reaction sauer, 9. Stunde 4,8 ccm., Reaction sauer, 10. Stunde 1 ccm., Reaction sauer. Im Ganzen 118,5 ccm.

Harnanalyse:	Gesamt-N	N(U) ⁺	N(NH ₃)	$\frac{N(U)^+}{N}$	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Vor der Operation	2,558%	2,272%	0,091%	88,82%	3,56%
In der 1. Stunde	2,370%	—	—	—	—
» » 2. und 3. Stunde	2,800%	2,280%	0,238%	81,43%	8,49%
» » 4. Stunde	2,021%	—	—	—	—
» » 5. und 6. Stunde	1,252%	1,014%	0,085%	80,97%	6,79%
» » 7. Stunde	1,302%	—	—	—	—
» » 8., 9. u. 10. St.	1,525%	1,057%	0,235%	69,34%	15,42%
Blut	NH ₃ in 100 g	1,48 mg			
Gehirn	»	»	9,71 mg		
Muskeln	»	»	14,50 mg.		

(Siehe S. 539.)

Hund Nr. 13.

11. V. 98. Ein männlicher Hund von 28,96 kg Gewicht, wurde am 10. Tage des Hungerns wie gewöhnlich operiert. Vor der Operation waren 500 ccm. Wasser mit 25 g Soda in den Magen eingeführt; beim Hunde stellte sich Erbrechen ein; dann waren noch 500 ccm. Wasser mit 15 g Soda eingeführt. Extirpation der Leber um 12 Uhr 30 Min. beendet.

1. 1 Uhr 30 Min. Harn 9 ccm. Reaction schwach sauer. Puls 88.

2. 2 Uhr. Puls 88. 40 ccm. Lösung, 1% Na₂CO₃ und 0,75% NaCl enthaltend, unter die Haut injicirt. 2 Uhr 30 Min. Harn 2,8 ccm. Reaction neutral. 80 ccm. Lösung unter die Haut. Puls 88.

3. 3 Uhr. Puls 94. 80 ccm. Lösung unter die Haut. 5,2 ccm. Harn. Reaction schwach alkalisch. 3 Uhr 30 Min. Puls 90—96. 40 ccm. unter die Haut. Kein Harn.

4. 4 Uhr. 80 ccm. Lösung unter die Haut. Kein Harn. Während der ganzen Zeit nach der Operation befindet sich der Hund in komatösem Zustande. 4 Uhr 30 Min. 1,4 ccm. Harn. Reaction schwach sauer. 80 ccm. Lösung unter die Haut. Puls 100.

5. 5 Uhr 5 Min. Messung des Blutdruckes. Druck 107,6. Curve Nr. 1. Leichte Muskelzuckungen. 1,5 ccm. Harn. Reaction sauer. 5 Uhr 30 Min. Kein Harn. Puls 120. Krampf- hafte seltene Respiration wie beim Shock. Reflectorische Erregbarkeit nicht erhöht. 5 Uhr 45 Min. Tracheotomie. Künstliche Respiration. Krämpfe haben aufgehört.

6 Uhr. Vollständiger Aderlass. Bei der Autopsie fand sich kein Blut in der Bauchhöhle. Im Magen kein Wasser. Harnblase leer. Gewicht der exstirpirten Leber 427 g. Gewicht des Restes vor den Ligaturen 29 g, hinter denselben 22 g (4,6°/o). Lebensdauer 5 Std. 30 Min. 15 g Soda in den Magen eingeführt, unter die Haut 4 g.

Harnanalyse:	Gesamt-N	N(NH ₃)	$\frac{N(NH_3)}{N}$
Vor der Operation	3,291 %	0,172 %	5,22 %
In der 3, 4. und 5. Stunde	1,391 %	0,241 %	17,30 %
Blut NH ₃ in 100 g	1,8 mg		
Gehirn „ „ 100 „	18,57 „		

Hund Nr. 14.

22. V. 98. Ein männlicher Hund von 24,67 kg Gewicht wurde am 11. Hungertage Tage operirt. Eine Stunde vor der Operation wurden 500 ccm. Wasser mit 10 g Soda in den Magen eingeführt. Vor der Operation, sowie nach derselben gewonnener Harn war alkalisch. Exstirpation der Leber um 12 Uhr 50 Min. beendet. Am Ende der Operation ein epileptiformer Anfall.

1. 1 Uhr 50 Min. 40 ccm. Kochsalzsodalösung subcutan. Harn 9,5 ccm. Reaction sauer.

2. 2 Uhr. Epileptische Krämpfe ausschliesslich im Gebiete der Kopf- und Halsmuskeln. Schmerzgefühl bewahrt. 2 Uhr 5 Min. Die Krämpfe haben aufgehört. Puls 120. 2 Uhr 10 Min. Wieder ein ähnlicher epileptiformer Anfall wie früher. 2 Uhr 15 Min. Die Krämpfe haben aufgehört. Der Hund will vom

Tisch aufstehen, man muss ihn mit Gewalt zurückhalten. 2 Uhr 20 Min. 3,4 ccm. Harn. Reaction sauer. 40 ccm. Lösung unter die Haut. 2 Uhr 28 Min. Heftiger epileptiformer Anfall mit leichtem Opisthotonus. 2 Uhr 35 Min. Der Anfall ist vorüber. Puls 140. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Harn 4,8 ccm. Reaction schwach sauer. Puls 130.

3. 3 Uhr 20 Min. 40 ccm. der Lösung unter die Haut. Harn 4 ccm. Reaction sauer. Puls 130. Beim Pfeifen erhebt der Hund den Kopf. 3 Uhr 50 Min. Harn 0,8 ccm. Reaction schwach sauer. Puls 188—190. 80 ccm. der Lösung unter die Haut.

4. 4 Uhr 20 Min. 0,1 ccm. Harn. 80 ccm. Lösung unter die Haut. Beim Pfeifen erhebt der Hund den Kopf und stöhnt. Bei der Injection winselt der Hund vor Schmerz. 4 Uhr 50 Min. Kein Harn. Bei starkem Pfeifen erhebt der Hund den Kopf.

5. 5 Uhr. 80 ccm. der Lösung unter die Haut. Der Hund wimmert vor Schmerz und bellt leise. 5 Uhr 50 Min. Beim Pfeifen öffnet er nur die Augen.

6. 6 Uhr. Seltene klonische Zuckungen in den vorderen Extremitäten. 6 Uhr 10 Min. Dieselben seltenen Zuckungen erscheinen auch in den Rumpfmuskeln. 6 Uhr 15 Min. Oefter sich wiederholende klonische Krämpfe. 6 Uhr 17 Min. Reflectorische Erregbarkeit erhöht. Krämpfe werden öfter. 6 Uhr 20 Min. Dieselben Erscheinungen, die mit der Zeit heftiger auftreten.

7. 6 Uhr 55 Min. Opisthotonus. Tetanus. 7 Uhr 5 Min. Vollständige Blutentleerung. Lebensdauer 6 Std. 15 Min.

Bei der Autopsie fanden wir in der Bauchhöhle 450 ccm. Blut. Wasser im Magen 52 ccm., Reaction sauer. Harnblase leer. 10 g Na_2CO_3 in den Magen eingeführt. 2 g unter die Haut. Harn vom Hunde gewonnen: 1. Std. 9,5 ccm. Reaction sauer. 2. Std. 8,2 ccm. Reaction sauer. 3. Std. 4,8 ccm. 4. Std. 0,1 ccm. Reaction sauer. Im Ganzen 22,6 ccm.

Analyse:

Blut	NH_3 in 100 g	2,05%
Gehirn	„ „ 100 „	15,24%
Muskeln	„ „ 100 „	14,12%
Die Schleimhaut des Magens		26,77%.

Qualitative Untersuchung des Harns.

Die verhältnissmässig geringen Mengen Harn, über welche wir für die qualitative Untersuchung verfügten, zwangen uns, uns auf das Wichtigste zu beschränken. Hier werden die Befunde angeführt, welche durch die qualitative Untersuchung des Harns von 4 Hunden gewonnen wurden, die in den Protokollen unter den entsprechenden Nummern beschrieben worden sind. Was die allgemeinen Eigenschaften des Harns der operirten Hunde anbelangt, so wird von denselben weiter unten bei der allgemeinen Besprechung aller in den Protokollen dargelegten Befunde berichtet werden.

Hund Nr. 2 (conf. Protokoll S. 522).

Zur qualitativen Untersuchung wurden benutzt 25 ccm., welche nach Entnahme von Proben zwecks quantitativer Bestimmung nachgeblieben waren, und zwar von 37 ccm. nach 2, 3 und 4 Stunden 22 ccm., von 18 ccm. nach 5 und 6 Stunden 3 ccm.

Die Untersuchung des mit Schwefelsäure angesäuerten Harns auf Gallenpigmente gab Spuren von Gallenfarbstoff. Die Anwesenheit von Urobilin war zweifellos erwiesen. Die Untersuchung des durch Aether extrahirten Harns auf Milchsäure gab ein negatives Resultat. Die übriggebliebene Flüssigkeit wurde nach der Trennung vom Aether, welcher zur Extraction der etwa vorhandenen Milchsäure benutzt worden war, filtrirt, und mit basischem Bleiacetat gefällt, das Filtrat wurde nach Entfernung des Bleis mit Schwefelwasserstoff im Vacuum verdampft und der Rest mit Alkohol extrahirt. Das Alkoholextract wurde aufs Neue im Vacuum verdampft. Im trockenen Reste fanden sich Harnstoffkrystalle. Dieser Rest wurde mit einer geringen Menge Alkohol extrahirt; nach Zufügung von Aether zum genannten Extract bildet sich ein krystallinischer Niederschlag, der sich bei der Untersuchung als Kreatin mit unbedeutenden Spuren von Kreatinin erwies. Die erhaltenen Krystalle vom Habitus des Kreatins waren nicht vollkommen rein, so dass ihre Menge nicht genau bestimmt werden konnte. Das Roh-

produkt wog etwas über 0,03 g. Direkt mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge gemischt, gab eine Probe der Krystalle sehr schwache Reaction auf Kreatinin. Es wurde daher, um alles Kreatin in Kreatinin überzuführen, die Gesamtmenge der Krystalle in wenig verdünnter Schwefelsäure gelöst und die Lösung auf dem Wasserbade verdunstet. Mit einer Probe des erhaltenen Rückstandes erhielten wir jetzt sehr scharf die Weidel-Salkowski'sche Reaction auf Kreatinin. Aus dem andern Theil des Präparates wurde Kreatininchlorzink und pikrinsaures Kreatinin krystallinisch dargestellt.

Der beim Stehen des Harns ausgefallene Niederschlag erwies sich bei der mikroskopischen Untersuchung als Harnsäure und gab die Murexidreaction.

Hund Nr. 6 (conf. Protokoll S. 525).

Die gesammte Menge Harn von 43,5 ccm. wird auf 24 Stunden bei 0° belassen. Der gebildete reichliche Niederschlag, welcher sich bei der Untersuchung als aus Uraten bestehend erweist, wird abfiltrirt und mit auf 0° abgekühltem Wasser ausgewaschen. Das Harnfiltrat wird beim Stehen dunkler (dunkelrothbraune Farbe) und gibt einen Absorptionsstreifen bei D; darauf wird die Farbe des Harns heller und es erscheint in ihm eine schwache grünliche Fluorescenz. Das Filter mit dem Niederschlag wird mit durch H_2SO_4 schwach angesäuertem Chloroform extrahirt. Im Chloroformextract ist unzweifelhaft die Anwesenheit von Bilirubin erwiesen worden; die Reactionen auf Urobilin ergaben ein negatives Resultat. Nach Verdampfung des Chloroforms bleiben im Schälchen ölige Tropfen nach, die auf Platinblech erhitzt den Geruch nach verbranntem Fett verbreiten.

Der von den ausgefallenen Uraten abfiltrirte Harn und das zum Auswaschen benutzte Wasser wird auf dem Wasserbade bis auf $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens eingengt und hierauf im Vacuum bis zum Trocknen eingedampft. Der trockene Rest von braunrother Farbe wird mit Schwefelsäure schwach angesäuert und mit Chloroform extrahirt. Der Chloroformextract wird zur Trockne verdunstet, der Rest in Alkohol

aufgelöst, alsdann soviel Wasser hinzugefügt, dass der Gehalt an Alkohol ca. 10% beträgt. Diese Lösung wird durch eine geringe Menge basisch-essigsauen Bleis und etwas Ammoniak gefällt. Der abfiltrirte Niederschlag wird mit Wasser ausgewaschen, bei mässiger Temperatur getrocknet und mit heissem absoluten Alkohol extrahirt und sofort abfiltrirt. Das Filtrat wird nach Zusatz von Na_2CO_3 bis zum Trocknen eingedampft. Der Rest wird in heissem Alkohol extrahirt und filtrirt. Das Filtrat beträgt ca. 2 ccm.; demselben wird 1 Tropfen einer 0,1%igen Lösung von Furfurol und 1 ccm. concentrirter Schwefelsäure hinzugefügt; das Gemisch wird in Schnee gestellt. Es erscheint eine Rosafärbung, welche nach 2 Stunden einen violetten Ton annimmt. Bei der spektroskopischen Untersuchung ist ein Streifen vor F. sichtbar. Es sind somit unzweifelhaft im Harn Gallensäuren vorhanden.

Harnstoff wurde in diesem Harn qualitativ durch alle Reactionen nachgewiesen.

Hund Nr. 8 (conf. Protokoll S. 526).

Im Harn wurde Bilirubin gefunden. Der Niederschlag erwies sich, wie auch in allen übrigen Fällen, als aus Uraten bestehend.

Hund Nr. 12 (conf. Protokoll S. 531).

Da hier grössere Harnmenge disponibel war, so prüften wir ihn auf etwaigen Gehalt an Milchsäure. Es wurde dazu der Harn von folgenden Stunden genommen: 2. und 3. Stunde 1,3 ccm., 4. Stunde 9,5 ccm., 5. und 6. Stunde 21 ccm., 7. Stunde 13,2 ccm., 8., 9. und 10. Stunde 3 ccm. Im Ganzen 48 ccm. Nach Entfernung der Urate durch Filtration wurde der Harn auf dem Wasserbade verdunstet, nach dem Erkalten mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert und mit Aether extrahirt. Der nach Verdunsten des Aetherextractes hinterbliebene syrupige Rückstand, mit Zinkoxyd gekocht, gab uns die charakteristischen Krystalle des Zinklactates. Das lufttrockene Salz wog 0,1632 g. Nach dem Trocknen bis zum constanten Gewicht bei 110°C . verlor die Substanz an Wasser 0,0204 g (12,5%). ZnO wurde gefunden 0,0484 g, entsprechend 27,22% Zn.

Für $(C_5H_5O_3)_2$, Zn + 2 H ₂ O	berechnet	gefunden
H ₂ O	12,9%	12,5%
ZnO	26,75%	27,22%.

Es ist somit die Anwesenheit der activen Milchsäure im Harn dieses Hundes unzweifelhaft erwiesen. Da der Hund vor der Operation 10 Tage gehungert hatte, so wurde zur Kontrolle der Harn eines normalen Hundes vom 12. Hungertage einer gleichen Bearbeitung unterworfen. Zur Untersuchung waren 200 ccm. Harn genommen worden. Das Resultat war ein negatives.

Nach Entfernung der Milchsäure wurde der Harn auf Harnstoff verarbeitet und nach der Vorschrift von Lüdy¹⁾ in Orthonitrobenzylidendiureid verwandelt. Der Schmelzpunkt des isolirten Diureids lag, wie der des reinen Präparates, bei 200°.

Der aus dem Harn ausgefallene Niederschlag erwies sich bei der Prüfung mit der Murexidprobe und bei der mikroskopischen Untersuchung als Harnsäure.

Allgemeines Resultat der Protokollbefunde.

Die Lebensdauer der operirten Hunde schwankte, wenn die äussersten der in den Protokollen angeführten Zahlen in Betracht gezogen werden, zwischen 3 Stunden 45 Min. und 13 Stunden. Da jedoch die äussersten Ziffern keine genaue Vorstellung dieses wichtigen Momentes geben, so führen wir hier die Lebensstunden eines jeden Hundes im Einzelnen an, wobei wir dieselben in aufsteigender Reihenfolge anordnen: 3 Stunden 45 Min. (Nr. 1), 5 Stunden (Nr. 9), 5 Stunden 20 Min. (Nr. 5), 5 Stunden 30 Min. (Nr. 13), 5 Stunden 45 Min. (Nr. 8), 6 Stunden 15 Min. (Nr. 14), 7 Stunden 20 Min. (Nr. 6), 8 Stunden (Nr. 10), 8 Stunden 15 Min. (Nr. 2), 9 Stunden 45 Min. (Nr. 11), 13 Stunden (Nr. 12). Wir können nicht den Grund oder vielmehr die Gründe anführen für diese Verschiedenheit eines jeden einzelnen Falles, da dieselbe unzweifelhaft das Resultat sehr vieler und complicirter Factoren ist. Als günstige Bedingungen sind jedenfalls anzuführen: Das

1) Wiener Monatshefte f. Chemie 10, 303. 310. 1890.

langdauernde vorübergehende Hungern, eine gute Harnabsonderung und die Einführung von Sodalösung in den Organismus des Hundes.

Damit die Erfolge dieser Operation keine zufälligen seien, sondern constante, ist es erforderlich, weitere, bisher unbekannte, jedoch wichtige Bedingungen festzustellen; dann kann unzweifelhaft das Leben der Thiere, denen die Leber entfernt worden ist, um ein Bedeutendes verlängert werden.

Der Zustand der Hunde nach der Operation weist einige Verschiedenheiten auf, gibt jedoch im Allgemeinen ein recht gleiches Bild der beobachteten Erscheinungen und kann in folgendem Schema verallgemeinert werden: Die erste Zeit nach der Operation befinden sich die Hunde noch unter dem Einflusse der Narkose, allmählich erholen sie sich von derselben und reagiren auf äussere Eindrücke. Der Grad dieser Reaction war nicht bei allen Hunden gleichmässig ausgeprägt. Einige reagirten die ganze Zeit über recht schwach auf äussere Eindrücke: Die Reaction beschränkte sich auf ein schwaches Emporheben des Kopfes, Wendungen der Augen oder Bewegungen der Ohren; andere wieder erhoben den Kopf, hielten denselben längere Zeit in dieser Lage, versuchten aufzustehen und würden sicher gegangen sein, was jedoch, wie bereits erwähnt, nicht zugelassen wurde. Der in den Protokollen unter Nr. 12 beschriebene Hund fühlte sich in der 6. Stunde nach der Operation dermassen gut, dass er wie ein normaler Hund auf Liebkosungen reagirte. Die angeführten Unterschiede beruhen, wie ersichtlich, nur in der Stärke der Reactionen und nicht im Charakter derselben. Nach einem derartigen, in einigen Fällen verhältnissmässig sehr guten Zustande fangen die Hunde an, die Schmerzempfindung zu verlieren, hören auf, auf äussere Eindrücke zu reagiren; es treten Krämpfe auf, die sich steigern und zuweilen in einem allgemeinen Tetanus endigen. Darauf erfolgt der Tod, wobei zunächst die Athmung sistirt und alsdann die Herzcontraction. Der Puls hält sich gewöhnlich die erste Zeit nach der Operation ungefähr auf 60—80 in einer Minute, alsdann folgt eine Beschleunigung, welche schnell zunimmt; endlich wird der Puls schwer zählbar.

Der Blutdruck wurde bei zwei Hunden bestimmt. Bei einem von diesen (Nr. 12) wurde die Bestimmung, angefangen von der 3. Stunde nach der Operation, in verschiedenen Zwischenräumen vorgenommen. Wir geben hier einige der Curven (vgl. Tafel IV Fig. 3—6). In der folgenden Tabelle sind die Befunde verzeichnet:

	3. Stunde	4. Stunde	6. Stunde	8. Stunde	9. Stunde	11. Stunde	12. Stunde
Puls	50	50	50	174	210	186	186
Blutdruck . .	81	96,8	88	100,6	83,6	69,6	53
Curve	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 7	Nr. 8

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich: Dass der Blutdruck erst zum Ende des Lebens stark zu sinken beginnt, bis dahin sich jedoch auf einer gewissen Höhe erhält, dass Beschleunigung des Pulses beobachtet wurde, und dass eine Verringerung der Harnabsonderung vor dem Sinken des Blutdrucks eintritt. Dasselbe Verhalten wurde auch beim Hunde Nr. 13 constatirt: In der 5. Lebensstunde betrug der Blutdruck 107,6 mm., der Puls war 120, die Harnabsonderung sistirte fast vollkommen. Das Sinken des Blutdruckes beim Hunde Nr. 12, welches zum Ende des Lebens beobachtet wurde, kann in gewissem Maasse in Abhängigkeit gesetzt werden von der inneren Blutung, da bei der Section des Hundes in der Bauchhöhle desselben nicht weniger als 500 ccm. Blut vorgefunden wurden. Der Grund für das Sistiren der Harnabsonderung und die Beschleunigung des Pulses liegt also nicht im Blutdruck, er muss vielmehr in den den Organismus vergiftenden Produkten gesucht werden, welche sich in ihm in Folge der Entfernung der Leber anhäufen. Wir bemerken hier, dass, um die Herzthätigkeit zu verlängern, wir beim Hunde Nr. 12, als die Pulsfrequenz in der Minute 190—198 war, den N. vagus am Halstheile reizten. Beim Reizen des N. vagus fiel die Pulsfrequenz auf 54 (siehe Tafel IV Fig. 5, Curve Nr. 6, *a* vor *b* nach der Reizung des N. vagus). Aus dem Sinken der Pulsfrequenz geht hervor,

dass die beschleunigte Herzthätigkeit nicht die Folge einer vollkommenen Lähmung oder Schwächung des Vagus ist, denn ungeachtet der anhaltenden — 5 Minuten langen — Reizung war seine Wirkung nicht geschwächt.

Die Athmung war Anfangs regelmässig 10—16 in der Minute, alsdann mit Beginn der Krämpfe, welche auch die Athmungsmuskeln ergriffen, unregelmässig.

Die Harnabsonderung nahm gewöhnlich in der ersten Zeit nach der Operation zu bis zu einem gewissen Moment und begann alsdann rasch zu sinken. Das Sistiren der Harnabsonderung fällt gewöhnlich mit der Beschleunigung des Pulses zusammen, ohne dass der Blutdruck sinkt. Die Gesamtmenge des Harns schwankte bei den einzelnen Hunden in ziemlich weiten Grenzen; in gewissem Grade stand sie in direkter Beziehung zur Lebensdauer. Die Gesamtmenge des Harnes eines jeden Hundes im Einzelnen ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Nr. des Hundes	Gesamtmenge des Harns	Lebensdauer
1	12	3 Stunden 45 Min.
2	73,8	8 „ 15 „
5	1,8	5 „ 20 „
6	43,5	7 „ 20 „
8	30,6	5 „ 45 „
9	28,3	5 Stunden
10	66,2	8 „
11	52,5	9 Stunden 45 Min.
12	118,5	13 Stunden
13	19,9	5 Stunden 30 Min.
14	22,6	6 „ 15 „

Das Sinken der Harnabsonderung erfolgt entweder relativ gleichmässig oder aber dieselbe bricht ziemlich plötzlich ab. Der Verlauf der Harnabsonderung nach Stunden ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich, welche als Beispiel angeführt werden mag:

	Hund Nr. 2	Puls	Hund Nr. 11	Puls	Hund Nr. 12	Puls	Blut- druck
1. Stunde	8,5	—	2,2	72	14,5	78	—
2. „	20,5	72	7,2	60—66	9,0	66—54	—
3. „	13,5	65	8,6	64—84	10,2	54—52	81
4. „	11,3	65	11,3	80—96	12,4	50	96,8
5. „	9,5	110	12,6	110	17,4	50	—
6. „	8,5	170	9,0	160	23,1	50—60	88
7. „	7,0	168	1,6	190	16,7	66—90	—
8. „	4,5	196	—	—	9,4	174	100,6
9. „	—	—	—	—	4,8	210	83,6
10. „	—	—	—	—	1,0	—	—

Aus den angeführten Curven (siehe Tab. IV, Fig. 1 u. 2) ist das Zusammenfallen des Sinkens der Harnabsonderung mit der Beschleunigung des Pulses klar ersichtlich. Wir enthalten uns zunächst von irgend welcher Erklärung dieses Zusammenfallens und bemerken nur, dass die Constanz der beobachteten Erscheinung den Gedanken an die Allgemeinheit des denselben hervorruhenden Momentes erweckt.

Was die Eigenschaften des Harns der operirten Thiere anbelangt, so erleiden sie einige Veränderungen, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht. Der Harn, welcher vor der Operation die gewöhnliche Farbe und Durchsichtigkeit hatte, wird in fast allen Fällen, angefangen bereits von der ersten Stunde, dunkel gefärbt, in den folgenden Portionen nimmt die dunkle Färbung deutlich zu; gleichzeitig wird der in den ersten Stunden nach der Operation beim Entleeren aus der Harnblase klare Harn beim Stehen trübe, es scheidet sich ein gelbgefärbter, bisweilen sehr reichlicher Niederschlag ab. Der Harn aus den am weitesten vom Schluss der Operation entfernten Stunden ist gewöhnlich bereits beim Entleeren trübe, bisweilen enthält er Gries. Die Trübung nimmt beim Stehen zu, es bildet sich am Boden des Gefässs ein reichlicher Niederschlag. Bei der mikroskopischen Untersuchung erweist sich der Niederschlag als aus Uraten und Harnsäurekrystallen bestehend, denen bisweilen auch Trippelphosphate in der charakteristischen Sargdeckelform beigemischt

waren. Es muss noch hinzugefügt werden, dass bei der Section in den Schleimhautfalten der Harnblase sehr häufig Harnsäure in Form von häufig recht grobkörnigem Gries gefunden wurde. Die bei der qualitativen Untersuchung des Harns gefundenen Gallenpigmente und -säuren haben dieselbe Herkunft wie in den Versuchen von Naunyn und Minkowski¹⁾ in dem Harn der Vögel, denen die Leber entfernt worden war; sie stammen aus der Galle, die in dem Darm der operirten Thiere nachgeblieben und darauf resorbirt worden war.

Zucker und Eiweiss wurden im Harn nicht gefunden, abgesehen von den Spuren von Eiweiss, welche in zwei Fällen beobachtet wurden und die aus dem während der Anlegung der Fistelöffnung in die Harnblase gelangtem Blut stammen. Das Eiweiss war nur in den ersten zwei Portionen vorhanden und verschwand in den folgenden vollkommen.

Die Reaction des Harns wurde in allen Fällen eine saure, selbst wenn dieselbe vor der Operation neutral oder alkalisch war. Eine gewisse Ausnahme stellen die Hunde dar, denen kohlen-saures Natron eingeführt wurde, doch auch in diesen Fällen wurde die Reaction zum Schluss eine saure. Aus 48 ccm. Harn des Hundes Nr. 12 wurde Milchsäure in einer Menge von 0,1053 g erhalten. Bei Beurtheilung dieser Menge ist das verhältnissmässig geringe Harnvolumen, welches zur Untersuchung genommen wurde, in Betracht zu ziehen; ausserdem fällt von diesem Volumen ein gewisser Theil auf die ersten Stunden, aus den letzten Stunden, der 8., 9. und 10., wurden nur 3 ccm. genommen.

Es fällt ausserdem der Umstand auf, dass aus 25 ccm. Harn des Hundes Nr. 2 nicht weniger als 0,03 g Kreatin erhalten wurde, was bei dem geringen Volumen des gesammten Harns auf eine gewisse Verstärkung der Ausscheidung desselben hinweist.

Bei der quantitativen Untersuchung des Harns war beabsichtigt worden, die Veränderungen zu bestimmen, die in der Vertheilung des Gesammtharnstoffs zwischen dem N des Harn-

1) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 1886. Bd. 21. S. 5.

stoffs und dem des NH_3 auftreten. Die folgende Tabelle weist auf die in dieser Hinsicht gefundenen Befunde hin:

Nr.	Vor der Operat.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8, 9, 10.	Bemerkungen
2.	66,5 2,75	— —	— —	— —	2, 3, 4 St. 74,7 6,9	— —	5 u. 6 St. 75,52 12,0	— —	7 u. 8 50,00 18,75	Die erste Zeile bei jedem Hunde bedeutet $\frac{N (U)}{N}$, die zweite $\frac{N (NH_3)}{N}$.
9.	86,22 3,58	87,48 5,90	78,48 —	— —	3 u. 4 St. 78,52 5,09	— —	— —	— —	— —	
10.	87,26 1,02	— —	— —	— —	— 3,60	— —	— —	6 u. 7 St. 72,41 11,87	— —	
11.	84,11 6,05	— —	— —	1, 2, 3 St. 78,78 6,89	82,74 6,02	80,79 8,73	— —	6 u. 7 St. 75,27 13,20	— —	
12.	88,82 3,56	— —	— —	3 u. 3 St. 81,43 8,49	— —	— —	5 u. 6 St. 80,97 6,79	— —	8, 9, 10 St. 69,24 15,42	
13.	— 5,22	— —	— —	— —	— —	— 3, 4, 5 St. 17,3	— —	— —	— —	

Wir sehen also, dass der Procentgehalt des N des Harnstoffs sinkt, während der des Ammoniak-N steigt; ein vollkommener Parallelismus findet jedoch zwischen beiden Erscheinungen nicht statt. Der Ammoniak-N weist eine unaufhaltsame und folgerichtige Tendenz zur Steigung auf; das Sinken des Harnstoffs-N wird erst in den letzten Lebensstunden deutlich. In dieser Hinsicht ist ein wesentlicher Unterschied zwischen den Gänsen von Minkowski und unseren Hunden vorhanden, dort findet ein ziemlich jähes Sinken des Harnsäure-N statt; die Leber der Vögel spielt somit eine viel wesentlichere Rolle bei der Bildung der Harnsäure im Vergleich zu der Rolle, welche der Leber der Säugethiere an der Bildung des Harnstoffs zufällt.

In Betreff der Harnsäure haben wir zu bemerken, dass ihre Anwesenheit in allen Fällen nachgewiesen worden ist; da jedoch eine quantitative Bestimmung derselben nicht vorgenommen worden ist, so fehlen uns die Thatsachen zur Beurtheilung der Veränderungen in ihrer Ausscheidung. Von einer Vermehrung ihrer Bildung auf Grund ihres reichlichen Ausfallens zu reden, ist natürlich nicht möglich, da diese Erscheinung leicht durch eine einfache Veränderung der Löslichkeitsbedingungen erklärt werden kann.

Die Bestimmung des NH_3 im Blut und den Organen gab folgende Resultate:

	Nummer des Hundes:									
	1.	2.	5.	6.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
NH_3 in 100 g Blut	—	2,75	4,61	2,6	1,98	1,63	1,81	1,48	1,8	2,06
Gehirn	18,45	18,20	20,38	20,96	22,44	18,78	18,42	9,71	18,57	15,24
Muskeln	—	18,30	15,52	19,60	15,10	—	—	14,50	—	14,12
Lebensdauer	3 St. 45	5 St. 15	5 St. 20	7 St. 10	5 St.	5 St.	9 St. 45	12 St.	5 St. 20	6 St. 15

Die aufmerksame Durchmusterung der angeführten Thatsachen führt zu dem äusserst wichtigen Schluss, dass der Tod der Hunde unter Entwicklung sämtlicher charakteristischen Erscheinungen eintreten kann ohne Vergrösserung des NH_3 -Gehaltes im Blut und Gehirn. Sehr lehrreich ist in dieser Hinsicht der Hund Nr. 12, der 13 Stunden lebte und bei welchem der NH_3 -Gehalt im Blut und Gehirn die Norm nicht überschritt.

Schlussfolgerungen.

Bei den Versuchen an Hunden mit exstirpirter Leber ist es im höchsten Grade interessant und lehrreich, dieselben den Befunden gegenüberzustellen, welche bei der Beobachtung von Hunden mit der Eck'schen Fistel allein erhoben worden sind. Bei Hunden, welche eine einfache uncomplicirte Venenfistel haben, treten vor Allem Erscheinungen einer **Ammoniak- resp. Carbaminsäurevergiftung** auf, welche sich sofort offenbart, sobald im Organismus die Bedingungen für die schnelle Produktion einer verhältnissmässig grossen Menge NH_3 eintreten. Die beobachtete Vergiftung ist hier das Resultat einer relativen Unzulänglichkeit der Leber im Umwandlungsprocess des NH_3 . Diese tritt auf nach reichlicher Fütterung mit Fleisch, wenn das Blut des Pfortadersystems angefüllt ist mit aus dem Magen-Darmkanal in Folge verstärkter Metamorphose in den Drüsenzellen herrührenden NH_3 ; ¹⁾ sie wird desgleichen beobachtet bei hungernden Hunden bei Einführung von Ammoniaksalzen und Amidosäuren (Glycocoll), welche im Organismus bei Abwesenheit der Leber zu Ammoniakverbindungen oxydirt werden ²⁾ in den Magen der Thiere. Die Eck'sche Fistel hat somit unzweifelhaft die Bedeutung der Leber hinsichtlich des aus dem Magen-Darmkanal herrührenden NH_3 zur Evidenz klargelegt. Von diesem Gesichtspunkt aus erscheint das Bild der Vergiftung vollkommen klar; diese Seite der Leberthätigkeit tritt so anschaulich hervor, dass die Betheiligung besonderer, sich hinzugesellender Factoren an der gesammten Erscheinung nur untergeordnete Bedeutung haben kann. Der Zusammenhang zwischen der relativen Unthätigkeit der Leber und der Anhäufung von NH_3 ist hier ein direkter,

1) Vgl. Nencki, Pawlow, Zaleski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1895. Bd. 37, S. 26.

2) Vgl. Salaskin, Zeitschr. f. phys. Chemie. 1898. Bd. XXV, S. 475.

unmittelbarer. Es ist durchaus nicht möglich, zu behaupten, dass bei den Eck'schen Hunden das NH_3 sich in Folge Vermehrung des Säuregehalts im Organismus anhäuft: Die Reaction des Harns ist bei ihnen, mit geringen Ausnahmen, stark alkalisch. Die einfache Berechnung der NH_3 -Mengen, die sich bei der Thätigkeit der Verdauungsdrüsen bilden, erklärt in vollkommen befriedigender Weise die beobachtete Anhäufung des NH_3 und folglich auch das Auftreten der durch dieselbe bedingten Vergiftung.

Die volle Exstirpation der Leber ruft complicirtere Störungen im Gange der allgemeinen Functionen des Organismus hervor, hier fällt vollkommen die Thätigkeit eines Organs aus, welches unzweifelhaft eine ungeheuerere Bedeutung im allgemeinen Haushalt des gesammten Körpers hat. Es genügt, die Betheiligung der Leber an der Umwandlung der Kohlehydrate, ihre Rolle in der Ausscheidung der Gallenpigmente und Gallensäuren u. s. w. in Betracht zu ziehen. Bei der gewöhnlichen Eck'schen Fistel bleiben diese Functionen erhalten, es bleibt auch die innere Secretion erhalten. Es ist somit bei der Exstirpation der Leber weit schwieriger, sich in den beobachteten Erscheinungen zurechtzufinden. Unsere Hunde mit der exstirpirten Leber erinnern in vielen Beziehungen an die Gänse von Minkowski. Von allen Erscheinungen, die hier und dort beobachtet sind, muss an erster Stelle hervorgehoben werden: bei den Gänsen von Minkowski das Auftreten von Milchsäure im Harn, bei unseren Hunden die saure Reaction des Harns, welche sogar durch Einführung grosser Gaben Soda nicht abgeändert werden konnte; in einem Fall konnten wir sogar unzweifelhaft in dem Harn des Hundes (Versuch 12) die Anwesenheit von Milchsäure nachweisen. Die volle Exstirpation der Leber führt also zur Erhöhung des allgemeinen Säuregehaltes des Körpers, welcher sich in der Vermehrung des Säuregehaltes des Harns kundgibt; es ist denkbar, dass die Vermehrung des NH_3 im Harn, sowie die Anhäufung desselben in einigen Fällen im Körper einen zweifachen Grund hat: 1. die Abwesenheit der Leber, welche das NH_3 umwandelt und 2. die Vermehrung des Säuregehaltes. Letztere übt somit dieselbe Wirkung aus, wie die

künstliche Einführung von Säuren. Es kann also hier ein Theil des NH_3 in gewisser Beziehung als der Säureindicator im Sinne von Münzer und Hallervorden¹⁾ angesehen werden, wenn angenommen wird, dass im Organismus, auch abgesehen von der Leber, wenn auch in beschränktem Maasse, eine Umwandlung des NH_3 möglich ist. Es kann somit hier von der Summirung der Wirksamkeit zweier Momente die Rede sein. Bei den Hunden mit exstirpirter Leber spielt das NH_3 im beobachteten Bilde der Vergiftung nicht eine bestimmende Rolle, wie es bei den Hunden mit einer einfachen Eck'schen Fistel der Fall ist, da in einigen Fällen die Menge des NH_3 im Blut und den Organen bei Vorhandensein aller Vergiftungserscheinungen normal gefunden wurde, was niemals bei erstmal operirten Hunden mit einer Eck'schen Fistel vorkommt. Auf diese Weise kann die Vermehrung des NH_3 im Harn und zuweilen im Blut und Gehirn bei vollkommener Entfernung der Leber erklärt werden; diese Erklärung kann jedoch, wie oben erwähnt, niemals für die Fistel-Hunde mit Venenfistel angewandt werden; bei diesen ist das NH_3 nicht die Folge der Entwicklung eines vermehrten Säuregehaltes des Körpers, sondern das NH_3 überschwemmt zeitweilig den Körper in Folge vermehrter Produktion desselben. Es ist der Ueberfluss des NH_3 , den der Organismus in Folge der Unzulänglichkeit der Leber nicht bewältigen kann. Aus diesem Grunde können wir mit vollem Recht voraussetzen, dass bei der Eck'schen Fistel keine Verminderung des CO_2 -Gehaltes im Blute sein kann; bei den Hunden mit exstirpirter Leber wird diese Verminderung wahrscheinlich gefunden werden, wie sie von Walter²⁾ bei künstlicher Säureeinfuhr gefunden wurde. Es ist vollkommen verständlich, dass durch Eingabe von Na_2CO_3 im Falle der Vermehrung des Säuregehaltes bei intacter Leber die NH_3 -Menge im Harn verringert werden kann. Ist die Leber nicht vorhanden, so kann das Alkali nur die Bedeutung haben,

1) Münzer, Prager medic. Wochenschr. 1897. Nr. 15—19.

Hallervorden, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 1880. Bd. 12, S. 237.

2) Walter, Arch. f. exp. Path. und Pharm. 1877. Bd. 7, S. 148.

das NH_3 aus seinen Verbindungen mit Säuren zu verdrängen und auf diese Weise die vollkommene Ausscheidung desselben im Harn zu begünstigen. In Betreff der im Organismus angehäuften sauren Produkte können wir vorläufig nichts Bestimmtes aussagen, sind jedoch der Ansicht, dass dieselben saure Zwischenprodukte des Eiweissstoffwechsels mit relativ hohem Molekulargewicht sind. Diese Produkte gehen wohl kaum in beträchtlicher Menge in den Harn über, wenn sie überhaupt übergehen. Die Frage, ob sie toxische direkte oder indirekte — durch Bindung der Alkalien — Wirkungen ausüben, bleibt natürlich offen. In Anbetracht des Auftretens von Oxyproteinsäure in beträchtlicher Menge bei mit Phosphor vergifteten Hunden¹⁾ ist die Anhäufung von Produkten ähnlicher Art denkbar. Zwecks Klarlegung dieser Fragen beabsichtigen wir unsere Untersuchungen an Hunden mit exstirpirter Leber fortzuführen. Auf Grund des oben Angeführten kann die Aufgabe besser präcisirt werden: sie wird hauptsächlich in der Aufsuchung der sauren Produkte, die sich im Organismus anhäufen, sowie in der Bestimmung der Basen und CO_2 im Blute bestehen.

Unsere Versuche bestätigen die Angabe von Nencki und Pawlow, dass nämlich der Harnstoff im Organismus auch ausserhalb der Leber gebildet wird. Wir wollen hier nur die Frage berühren, ob ausschliesslich in der Leber sich der Theil des Harnstoffs bildet, der speciell aus Ammoniak entsteht. Die Hunde mit einer einfachen Venenfistel zeigen, dass sie die Menge NH_3 , welche bei ihnen als Resultat des allgemeinen Stoffwechsels auftritt, sowie des Stoffwechsels, welcher in den Verdauungsdrüsen vor sich geht, bei mässiger Thätigkeit derselben gut bewältigen können: unter diesen Bedingungen wird keine Anhäufung desselben im Blute, sowie keine besondere Vermehrung des Procentgehaltes an Ammoniak-Stickstoff im Harn beobachtet. Wenn sich jedoch die Thätigkeit der Verdauungsdrüsen steigert, oder in den Magen künstlich Ammoniak-

¹⁾ Bondzynski und Gottlieb, Centr. f. d. medic. Wissensch. 1897. Nr. 33, S. 577—586.

salze eingeführt werden, so entwickelt sich das Bild einer Ammoniak- respective Carbaminsäurevergiftung. Dieses Verhalten kann am einfachsten in dem Sinne erklärt werden, dass, bei Anwesenheit unbedeutender Mengen des im Organismus gebildeten NH_3 , die Betheiligung der Leber an dessen Umwandlung genügt, welche Dank des Blutumlaufs der art. hepatica erfolgt; bei der Vermehrung des NH_3 -Gehaltes und bei seiner gleichzeitigen Anhäufung macht sich die Abwesenheit des Pfortaderblutumlaufs bemerkbar; am nächsten liegt es folglich, anzunehmen, dass das NH_3 respective Carbaminsäure entweder ausschliesslich oder vorwiegend durch die Leber in Harnstoff übergeführt wird, dass folglich in den übrigen Theilen des Organismus diese Umwandlung entweder gar nicht vor sich geht oder dass dieselbe eine sehr beschränkte ist. Die beschränkte Ueberführung des NH_3 in den Harn bei den Hunden mit Venenfistel durch den vermehrten Säuregehalt des Körpers zu erklären, ist nicht möglich, da derselbe bei ihnen, wie oben angegeben, nicht vorhanden ist.

Bei den Hunden mit Venenfistel wird das beobachtete Bild der Vergiftung durch die Anhäufung von **Ammoniak** hervorgerufen, bei den Hunden mit exstirpirter Leber tritt vor Allem die **Säurevergiftung** hervor, oder genauer gesagt durch die sich im Körper anhäufenden saueren Producte, die vielleicht ausser durch ihre saure Reaction noch durch ihre anderen Eigenschaften für den Organismus toxisch sind.

Das sind die allgemeinen Schlüsse, welche wir vorläufig auf Grund des vorhandenen Thatfachenmaterials zu machen für möglich halten. Die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen, und weitere Versuche, die wir in dieser Richtung auszuführen beabsichtigen, müssen eine feste experimentelle Begründung der von uns ausgesprochenen Ansichten geben.

Weiteres über die Lymphe nach Injection von Tetanusgift.

Von

Dr. F. Ransom.

(Aus der Abtheilung für experimentelle Therapie
des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie der Universität Marburg.)
(Der Redaction zugegangen am 28. Mai 1900.)

In einer in der vorigen Nummer dieser Zeitschrift erschienenen Arbeit sind die Versuchsergebnisse mitgetheilt worden, welche ich bei einer vergleichenden Untersuchung des Blutes und der Lymphe von Hunden nach intravenöser Injection von Tetanusgift bezw. Tetanusantitoxin erhielt. In dem folgenden Bericht möchte ich zunächst die oben erwähnte Arbeit in einem Punkte ergänzen und dann einige Versuche, welche die Resorptionswege des Tetanusgiftes sowie des Tetanusantitoxins nach subcutaner Verabreichung ermitteln sollten, besprechen.

Zu den Untersuchungen über die Vertheilung des Tetanusantitoxins zwischen dem Blute und der Lymphe im Hundekörper nach intravenöser Injection hatte ich das Antitoxin in der Form von Serum eines immunisirten Pferdes, also eine dem Hundesystem fremde Serumart, angewandt. Damals stand mir kein anderes hochwerthiges Serum zur Verfügung. Jedoch wäre es möglich, dass das Antitoxin in der Form von Serum eines immunisirten Hundes sich anders als ein fremdartiges antitoxisches Serum im Hundekörper verhält. Eine Ergänzung der Versuche in dieser Richtung schien mir daher erforderlich und ist jetzt ausgeführt worden. Ein mir von Professor Behring zur Verfügung gestellter Hund, welcher gegen Tetanus isopathisch immunisirt worden war, lieferte ein Serum, dessen Antitoxinwerth etwas mehr als $\frac{1}{5}$ A. E. (= 8 Millionen — Ms) in 1 ccm. betrug. Von diesem Serum habe ich 15 ccm. in die Blutbahn eines anderen Hundes gebracht, dessen Blut und

Lympe dann in bestimmten Zeitabschnitten auf Antitoxin geprüft wurden. Die Lympe ist von dem geöffneten Ductus thoracicus, das Blut von der rechten Arteria femoralis entnommen worden.

Die Prüfungen sind mit dem Serum der Lympe bzw. des Blutes ausgeführt worden.

Versuch 1.

Einführung von antitoxischem **Hundeserum** in die Blutbahn eines **Hundes**.

Protokoll 1.

Hund 11	26. III. 1900.	Blieb gesund.
7200 g	10 Uhr 45 Min. Ductus thoracicus geöffnet.	
	10 „ 57 „ 15 ccm. antitoxisches Hundeserum intravenös.	
	11 Uhr Injection fertig.	
	2 „ Blutentnahme.	
	5 „ „	

Die Lympe floss continuirlich in geeignete Behälter ab, welche zunächst $\frac{1}{4}$ stündlich, nachher $\frac{1}{2}$ stündlich gewechselt wurden. Einige von diesen Lymph- sowie die beiden Blutproben untersuchte ich auf ihren Antitoxinwerth. Die Ergebnisse der Prüfungen sind in Tafel 1 wiedergegeben.

Tafel 1.¹⁾ Hund 11.

Lymphserum.

Zeit nach der Injection	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Antitoxinwerth in 1 ccm. circa
Erste Viertelstunde	12 000 — Ms 20 000 — Ms 40 000 — Ms	○ + $\frac{1}{2}$ Tage + 36 Stunden	15 000 — Ms
Zweite Viertelstunde	100 000 — Ms 200 000 — Ms	○ + 36 Stunden	100 000 — Ms

¹⁾ Was die Erklärung der Zeichen und Abkürzungen u. s. w. betrifft, verweise ich auf die Anmerkung zu der vorigen Arbeit.

Zeit nach der Injection	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Antitoxinwerth in 1 ccm. circa
1 Stunde bis 1 1/2 Stunden	40 000 — Ms 100 000 — Ms 200 000 — Ms	○ + 7 1/2 Tage + 36 Stunden	95 000 — Ms
3 Stunden bis 3 1/2 Stunden	40 000 — Ms 100 000 — Ms 200 000 — Ms	○ + 6 1/2 Tage + 36 Stunden	90 000 — Ms
5 Stunden bis 5 1/2 Stunden	100 000 — Ms 200 000 — Ms	+ 3 Tage + 36 Stunden	80 000 — Ms
6 Stunden bis 6 1/2 Stunden	40 000 — Ms 100 000 — Ms	○ + 2 1/2 Tage	75 000 — Ms

Blutserum.

3 Stunden	200 000 — Ms 240 000 — Ms	○ + 4 1/2 Tage	220 000 — Ms
6 Stunden	200 000 — Ms 240 000 — Ms 300 000 — Ms	○ + 3 1/2 Tage 2 Tage	200 000 — Ms

Die Zeiten der Blutentnahmen sowie die Zeitabschnitte für die Lymphe sind vom Moment der fertigen Antitoxineinverleibung berechnet.

Aus der Tafel ersehen wir, dass das Antitoxin sehr bald nach der Injection in der Lymphe zu finden war. Schon in der Probe, welche während der ersten Viertelstunde nach der Injection aufgefangen wurde, konnte ich zwischen 12000 und 20000 — Ms und in der Lymphe von der zweiten Viertelstunde etwa 1000000 — Ms in 1 ccm. nachweisen. Die Lymphe, welche in dem Zeitraum von 1 bis 1 1/2 Stunden nach

der Injection abfloss, hatte einen etwas niedrigeren Werth. Dieses Sinken des Antitoxingehalts der Lymphe setzte sich, wie ein Blick auf die fünf Prüfungen auf 100000 — Ms in 1 ccm. deutlich beweist, bis zum Ende des Versuches fort.

Demnach hatte der Antitoxingehalt der Lymphe ziemlich schnell ein Maximum erreicht, dem bald ein Antitoxinverlust folgte. Blut wurde drei und sechs Stunden nach der Antitoxininjection entnommen. Betrachten wir die Prüfungen der beiden Blutproben, so ersehen wir, dass das Serum des erstgenommenen Blutes einen etwas höheren Antitoxinwerth zeigte, als bei der zweiten Probe gefunden wurde.

Sehr interessant ist ein Vergleich zwischen dem Blute und der Lymphe in Bezug auf Antitoxinwerth; hierbei erfahren wir, dass, wie in meinen früheren Versuchen, wozu ich mich eines antitoxinhaltenden Pferdeserums bediente, so auch hier, als ich dem Hundekörper Hundeserum beibrachte, der Antitoxinwerth des Blutes am Ende des Versuches (6 Stunden nach der Injection) erheblich höher als der der Lymphe war. Die Zahlen sind 200000 — Ms in 1 ccm. Blutserum und 75000 — Ms in 1 ccm. Lymphserum, ein Verhältniss von ca. 2,5 : 1.

Vom physiologischen Standpunkt aus und in Anbetracht der nahen Beziehungen zwischen dem Antitoxin und der Proteinstoffe des Serums ist diese Beobachtung von gewisser Bedeutung. Alle unsere bisherigen Erfahrungen machen es unwahrscheinlich, dass das Antitoxin allein für sich aus dem Blute in die Lymphe übergeht, vielmehr dürfen wir annehmen, dass es wenigstens zu einem Theil des Serumproteins in inniger Beziehung steht¹⁾ und mit diesem übertritt. Reines bzw. proteinfreies Antitoxin zu bekommen, ist bis jetzt Niemandem gelungen. Wenn wir nun ein so zu sagen mit einem Stempel versehenes Protein in die Blutbahn einführen und finden, dass es sich zwischen Blut und Lymphe in einem Ver-

¹⁾ Seng, Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. Bd. XXXI.

Marcus, Diese Zeitschr. Bd. XXVIII, Heft 5 und 6.

Freund und Sternberg, Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. Bd. XXXI.

hältniss von ca. $2\frac{1}{2}$ im Blute zu 1 in der Lymphe vertheilt, so ist damit, glaube ich, ein nicht unwesentlicher Beitrag zur Frage der Entstehung der Lymphe gebracht. Auf der andern Seite spricht dieser Befund für die Vermuthung, dass das Antitoxin ein Proteinstoff sei, denn in dem Blutlymphkreislauf verhält es sich wie die darin enthaltenen normalen Proteine, indem etwas mehr als zweimal so viel im Blute zurückbleibt, als in die Lymphe übergeht. Im Uebrigen geht aus diesem und den vorigen Versuchen hervor, dass die Vertheilung des Antitoxins im Hundekörper nach intravenöser Injection in ähnlicher Weise vor sich geht, ob das Serum von einem Hunde oder einem Pferde stammt.

Ich gehe jetzt über zu der Erörterung der Frage: Wie betheiligt sich die Lymphe an der Verbreitung des Tetanusgiftes und des Tetanusantitoxins nach subcutaner Injection?

Versuch 2.

Eröffnung des Ductus thoracicus und bald darauf folgende subcutane Injection einer grösseren Menge Tetanusgift.

Protokoll 2.

Hund 15	10. IV. 1900.	11. IV. ○
8400 g.	10 Uhr 45 Min. Eröffnung des Ductus thoracicus.	12. IV. —
	11 Uhr. 4,5 ccm. <u>Tetanusgift Nr. 5 v. 4. IV. 1900</u>	13. IV. =
	60	14. IV. =
	Subcutan in der linken Inguinalgegend,	15. IV. +
	= circa 500 + Ms pro 1 g.	
	11 Uhr 15 Min. Blutentnahme.	
	11 „ 30 „ „	
	12 „ 00 „ „	
	1 „ 00 „ „	
	3 „ 00 „ „	
	5 „ 00 „ „	

Das Blut wurde aus der rechten Arteria femoralis entnommen. Sodann erfolgte die Feststellung des Giftwerthes der Lymphe und des Blutes. Die Ergebnisse der verschiedenen Prüfungen sind in Tafel 2 wiedergegeben.

Tafel 2. Hund 15.

Lymphserum.

Zeit nach der Injection	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Werth in 1 ccm. circa
Zweite Viertelstunde	24 + Ms	○	○
1 Stunde bis 1 1/2 Stunden	27 + Ms	—	10 + Ms
2 Stunden bis 2 1/2 Stunden	25 + Ms 112 + Ms	+ 2 1/2 Tage + 4 1/2 Tage	100 + Ms
3 Stunden bis 3 1/2 Stunden	80 + Ms 230 + Ms	+ 2 1/2 Tage + 4 1/2 Tage	200 + Ms
4 Stunden bis 4 1/2 Stunden	160 + Ms 360 + Ms	+ 36 Stunden + 2 1/2 Tage	500 + Ms
5 Stunden bis 5 1/2 Stunden	20 + Ms 320 + Ms 1280 + Ms	+ 20 Stunden + 36 Stunden + 4 Tage	1280 + Ms

Blutserum.

Erste Viertelstunde	20 + Ms	○	○
1 Stunde	28 + Ms 40 + Ms	— Spur	5 + Ms
4 Stunden	30 + Ms 160 + Ms	== —	25 + Ms
6 Stunden	24 + Ms 640 + Ms	+ 3 1/2 Tage ○	35 + Ms

Die Resultate sind ganz unzweideutig. Das Tetanusgift fliesst mit der Lymphe aus dem subcutanen Gewebe in die Lymphgefässe über und erreicht so die Blutbahn. Von den Blutcapillaren wird es nicht oder nur in kleinen Mengen aufgenommen. Das Gift war zwar in kleinen Quantitäten in den Blutproben nachweisbar, jedoch erst eine Stunde nach der Injection und dann nur spurweise. Vier Stunden nach der Injection waren etwa 25 + Ms und noch zwei Stunden später etwa 35 + Ms in 1 ccm. Blutserum.

Diese kleinen Giftmengen, welche sich in der Blutbahn befanden, sind aller Wahrscheinlichkeit nach dahin gelangt, entweder durch Verbindungen zwischen der Lymph- und Blutbahn unterhalb der Einmündung des Ductus thoracicus, oder durch direkte Anastomosen zwischen den Blut- und Lymphcapillaren, die ja thatsächlich existiren sollen. Wie dem auch sei, es kann keinem Zweifel unterliegen, dass, wenn nicht die ganze, so doch die Hauptmenge des resorbirten Giftes das Blut via der Lymphbahn erreichte.

Vom Ende der ersten Stunde nach der Injection an stieg der Giftwerth der Lymphe fortwährend bis zum Schluss des Versuches, zu welcher Zeit ich ca. 1300 + Ms in 1 ccm. fand, also ungleich mehr, als zur entsprechenden Stunde im Blute vorhanden war.

Immerhin ist die Beförderung des Giftes die Lymphwege entlang keine schnelle gewesen. Es wurden ca. $4\frac{1}{2}$ Millionen + Ms in 4,5 ccm. Flüssigkeit subcutan gegeben und dennoch enthielt die $5\frac{1}{2}$ Stunden nach der Injection aus dem Ductus thoracicus abfliessende Lymphe nur etwa 1300 + Ms in 1 ccm. In der Lymphe, welche während der zweiten Viertelstunde nach der Injection abfloss, war noch immer kein Gift nachweisbar, ein Ergebniss, welches nicht allein durch die natürliche Langsamkeit des Lymphstromes¹⁾ zu erklären wäre. Andererseits hat eine Stockung in der Canüle nicht stattgefunden, im Gegentheil, der Abfluss aus dem Ductus betrug

¹⁾ Tschirwinsky, Zur Frage über die Schnelligkeit des Lymphstromes. Centralblatt f. Physiol. 1895. Bd. 9. S. 49.

ziemlich regelmässig für die ganze Dauer des Versuches 8 bis 10 ccm. in je einer halben Stunde. Unter diesen Umständen und in der Hoffnung, die Sachlage etwas mehr aufzuklären, machte ich folgenden Versuch:

Versuch 3.

Eröffnung des Ductus thoracicus und bald darauf subcutane Injection einer kleineren Menge Tetanusgift.

Protokoll 3.

Hund 14 13 200 g.	16. IV. 1900.		Starb an Tetanus.
	11 Uhr 40 Min.	Eröffnung des Ductus thoracicus.	
	11 Uhr 45 Min.	1,1 ccm. <u>Tetanusgift Nr. 5 v. 4. IV. 1900</u> 5	
	subcutan in der linken Inguinalgegend, = 100 + Ms pro 1 g.		
	Während 5 Minuten leichte Massage der Injectionsstelle.		

Obschon die Lymphe, welche ohne Unterbrechung abfloss, halbstündlich bis zu 5¹/₂ Stunden nach der Injection geprüft wurde, habe ich kein Gift darin nachweisen können und gleichfalls keines in dem zu 1, 3 und 5 Stunden nach der Injection untersuchten Blute. Trotzdem starb der Hund später an Tetanus. Dieses Ergebniss machte es erforderlich, die Lymphe längere Zeit nach der Injection zu prüfen.

Versuch 4.

Subcutane Injection einer kleineren Menge Tetanusgift und fünf Stunden später Eröffnung des Ductus thoracicus.

Protokoll 4.

Hund 17 13 000 g	1. V. 1900.		Starb an Tetanus.
	7 Uhr Morgens.	1,3 ccm. <u>Tetanusgift Nr. 5 v. 4. IV. 1900</u> 6	
	subcutan in der linken Inguinalgegend, = 100 + Ms pro 1 g.		
	12 Uhr 15 Min. Eröffnung des Ductus thoracicus.		

Zwischen der Einführung des Giftes und der Eröffnung des Ductus konnte der Hund sich frei im Zimmer bewegen.

Die Lymphe, welche in dem Zeitraum von 10 bis 10¹/₂ Stunden nach der Injection aufgefangen wurde, enthielt ca. 15 + Ms in 1 ccm. Das Blut, welches 10 Stunden nach der

Injection entnommen wurde, hatte etwa $8 + Ms$ in 1 ccm. Von der 5. bis zur 10. Stunde nach der Injection wurden in der Lymphe sowie im Blute bei den verschiedenen Prüfungen nur ganz kleine Mengen Gift gefunden — keine Maus starb.

Am 5. V. 1900, 4×24 Stunden nach der Injection, wurde etwas Blut aus einer Arterie entnommen, die Prüfung ergab ca. $20 + Ms$ in 1 ccm. Also mehr als nach 10 Stunden. Am 9. V. 1900 = 8×24 Stunden nach der Injection nahm ich nochmals Blut ab und fand in 0,5 ccm. desselben genug Gift, um eine Maus von 16 g Gewicht deutlich krank zu machen. Demnach dauerte die Giftzufuhr aus dem Gewebe nach dem Blute mindestens 4×24 Stunden. Es geht aus diesen Versuchen hervor, dass das Tetanusgift (bei den angewandten Dosen) nur langsam aus dem subcutanen Gewebe in den Blutkreislauf gelangt.

Wir wenden uns jetzt zu der Frage: Wie erreicht das Tetanusantitoxin die Blutbahn, wenn es subcutan gegeben wird?

Die Einzelheiten in Bezug auf die Schnelligkeit, mit welcher das Tetanusantitoxin nach subcutaner Injection in der Blutbahn erscheint und wieder aus derselben verschwindet, sind genügend bekannt und ich hätte mich daher nur mit der Frage zu beschäftigen: Wie gelangt das Tetanusantitoxin aus dem subcutanen Gewebe in die Blutgefäße?

Versuch 5.

Eröffnung des Ductus thoracicus und bald darauf subcutane Injection von Tetanusantitoxin.

Protokoll 5.

Hund 13	29. III. 1900.	Blieb
6700 g.	11 Uhr 45 Min. Eröffnung des Ductus thoracicus.	gesund
	12 Uhr 5 ccm. Tet. A. N. ¹⁰ Nr. 60	
	subcutan in der linken Inguinalgegend.	
	= 300 000 — Ms pro 1 g.	
	1 Uhr Blutentnahme	
	4 „ „	
	6 „ „	

Ein Blick auf Tafel 3 genügt, um die Thatsachen zu erkennen.

Tafel 3. Hund 13.

Lymphserum.

Zeit nach der Injection	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Werth in 1 ccm. circa
Erste Viertelstunde	100 — Ms 500 — Ms	+ 36 Stunden + 36 Stunden	?
Zweite Viertelstunde	100 — Ms 500 — Ms 3 000 — Ms	+ 2 1/2 Tage + 36 Stunden + 31 Stunden	50 — Ms
1 Stunde bis 1 1/2 Stunden	3 000 — Ms 30 000 — Ms	○ + 6 1/2 Tage	6 000 — Ms
2 Stunden bis 2 1/2 Stunden	30 000 — Ms 200 000 — Ms	— + 18 Stunden	25 000 — Ms
3 Stunden bis 3 1/2 Stunden	30 000 — Ms 60 000 — Ms 200 000 — Ms	○ — + 36 Stunden	55 000 — Ms
4 Stunden bis 4 1/2 Stunden	100 000 — Ms 120 000 — Ms 400 000 — Ms	○ Spur + 36 Stunden	100 000 — Ms

Blutserum.

1 Stunde	500 — Ms 3 000 — Ms	+ 3 1/2 Tage + 33 Stunden	100 — Ms
4 Stunden	500 — Ms 1 000 — Ms 3 000 — Ms	— = + 36 Stunden	200 — Ms
6 Stunden	500 — Ms 1 000 — Ms 3 000 — Ms	— — + 2 1/2 Tage	300 — Ms

Das Antitoxin wird mittelst der Lymphbahnen in den Blutkreislauf geführt. Die Blutcapillaren nehmen das Antitoxin nicht oder nur in sehr kleinen Mengen unmittelbar aus dem subcutanen Gewebe auf.

Schon in der Lymphe, welche während der zweiten Viertelstunde nach der Injection aufgefangen wurde, war die Gegenwart von Antitoxin durch die Verzögerung des Todes bei der Maus, die zur Prüfung auf 100 + Ms diente, angedeutet. Der Antitoxinwerth der Lymphe stieg dann während der nächsten Stunden, so dass zwischen 4 und 4 $\frac{1}{2}$ Stunden nach der Injection etwa 120 000 — Ms in 1 ccm. Lymphserum gefunden wurden. Es ist anzunehmen, dass die Steigerung des Antitoxinwerthes der Lymphe zum Theil auf der allmählichen Ausbreitung des Serums in dem subcutanen Gewebe beruht, wobei immer mehr Lymphwege in Betracht kommen würden.

Im Vergleich zu der Lymphe hatte das Blut sehr wenig Antitoxin aufzuweisen. Vier Stunden nach der Injection, zu einer Zeit, als die Lymphe 120 000 — Ms in 1 ccm. enthielt, waren in derselben Menge Blutserum nur etwa 150 bis 200 — Ms, zwei Stunden später war der Werth des Blutserums nur wenig höher. In der That enthielt das Blut eine so kleine Menge Antitoxin, dass wir wohl annehmen dürfen, ihre Erklärung sei in unbedeutenden Verbindungen und Anastomosen zwischen Blut- und Lymphbahn zu finden.

Aus den Versuchen an den Hunden Nr. 13 und 15 haben wir erfahren, dass das Tetanusgift sowie das Tetanusantitoxin von dem subcutanen Gewebe aus, wenigstens was den weitaus grössten Theil betrifft, mittelst der Lymphwege die Blutbahn erreicht. Es schien mir noch von Nutzen, zu ermitteln, wo und wann sich die beiden Körper im Hundesystem neutralisiren. In diesem Gedanken habe ich folgenden Versuch ausgeführt.

Versuch 6.

Intravenöse Einführung von Tetanusgift und 24 Stunden später Injection von Tetanusantitoxin gleichfalls intravenös.

Protokoll 6.

Hund 16 3250 g.	17. IV. 1900. 10 Uhr Morgens	Starb in Folge der Operation.
	0,7 ccm. <u>Tet.-Gift Nr. 5 v. 4. IV. 1900</u>	
	15	
	in die Ohrvene links.	
	= ca. 86 + Ms pro 1 g.	
	18. IV. 1900. 10 Uhr Morgens.	
	Eröffnung des Ductus thoracicus.	
	Blutentnahme v. Arteria femoralis.	
	10 Uhr 35 Min. 1 ccm. <u>Tet. A. N.¹⁰ Nr. 60</u>	
	140	
	in d. V. jugul. ext. rechts.	
	= ca. 870 — Ms pro 1 g.	

Demnach bekam der Hund intravenös eine sicher tödtliche Dosis Tetanustoxin, der 24 Stunden später 10fach die zur Neutralisation nöthige Antitoxindosis nachgeschickt wurde. Die Vergleichung der Blut- und Lymphproben von kurz vor und kurz nach der Injection des Antitoxins ergab die interessanten Resultate, welche in Tafel 4 aufgestellt sind.

Tafel 4. Hund 16.

Lymphserum.

Zeit	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Werth in 1 ccm. circa
24 Stunden nach der Giftinjection	60 + Ms	=	45 + Ms
	200 + Ms	—	

Blutserum.

24 Stunden nach der Giftinjection	58 + Ms 200 + Ms	+ 5 1/3 Tage —	50 + Ms
---	---------------------	-------------------	---------

Vor der Antitoxininjection.

Lymphserum.

Zeit	Geprüft auf in 1 ccm.	Verlauf	Werth in 1 ccm. circa
Erste Viertel- stunde nach der Antitoxin- injection	23 + Ms	+ 6 Tage	15 + Ms
Zweite Viertel- stunde nach der Antitoxin- injection	23 + Ms .	—	6 + Ms
Dritte Viertel- stunde nach der Antitoxin- injection	23 + Ms	○	○
Blutserum			
Eine Viertel- stunde nach der Antitoxin- injection	26 + Ms	○	○
Eine Halbe- stunde nach der Antitoxin- injection	22 + Ms	○	○

Nach der Antitoxininjection.

Zunächst musste der Toxinstand des Blutes und der Lymphe so kurze Zeit als möglich vor der Antitoxininjection ermittelt werden. Zu diesem Zweck öffnete ich 24 Stunden nach der Einführung des Giftes den Ductus thoracicus, um Lymphe zu bekommen, und entnahm zu gleicher Zeit Blut aus der Arteria femoralis. Eine halbe Stunde später injicirte ich das Antitoxin in die rechte Vena jug. ext. Die Lymphmengen, welche während der ersten, zweiten und dritten Viertelstunde nach der Antitoxininjection abflossen, wurden einzeln aufgefangen. Eine Viertel- und eine Halbestunde nach der Anti-

toxininjection entnahm ich je eine Blutprobe aus der Arteria femoralis.

Wie zu erwarten war, enthielt das Blut sowie die Lymphe 24 Stunden nach der intravenösen Einführung von ca. 86 + Ms pro 1 g noch immer einen deutlichen Rest des verabreichten Giftes — in der Lymphe etwa 45 + Ms, im Blutserum etwa 50 + Ms. in 1 ccm. Zu diesem Giftreste stösst nun das nachgeschickte Antitoxin und aus der Tafel ersehen wir, dass schon nach einer Viertelstunde (früher ist nicht untersucht worden) kein Gift mehr im Blute nachweisbar war. Auch zu der Lymphe drängte sich das Antitoxin schnell durch. Während der ersten Viertelstunde nach der Einführung des Antitoxins fiel der Giftwerth der Lymphe zu etwa $\frac{1}{3}$ des Werthes, welcher kurz vor der Injection gefunden worden war. Die Lymphe, welche während der zweiten Viertelstunde nach der Antitoxininjection aufgefangen wurde, enthielt in 0,5 ccm nur eben genug Gift, um einer Maus von 11,5 g Gewicht einen ganz leichten Tetanus zu geben. Schliesslich in der dritten Viertelstunde waren schon alle Kennzeichen des Giftes auch aus der Lymphe verschwunden.

Der Versuch beweist, dass nicht nur das sich im Blute befindende, sondern auch das aus der Blutbahn ausgetretene sich in der Lymphe aufhaltende Gift vom nachgeschickten Antitoxin schnell erreicht und neutralisirt wird.

Schliesslich wäre zu erwähnen, dass die eben mitgetheilten Resultate in einer Beziehung einen praktischen Wink für die Behandlung des Tetanus mit Antitoxin geben. Was nämlich die Wahl der Injectionsstelle betrifft, so unterstützen meine Versuche den schon von Tizzoni und Behring ertheilten Rath: das Antitoxin möglichst nahe an der inficirten Wunde einzuspritzen. Wie wir gesehen haben, wird das Tetanusgift hauptsächlich durch die Lymphgefässe nach der Blutbahn befördert, und zwar ist diese Beförderung eine auffallend langsame; vielleicht setzen die Lymphdrüsen gewisse

Hindernisse einem schnelleren Transport entgegen. Auch das Antitoxin wird in die Lymphbahn aus dem subcutanen Gewebe aufgenommen. Aus diesen Gründen empfiehlt es sich, um eine möglichst schnelle Neutralisation des Giftes zu bewirken, das Heilserum so einzuspritzen, dass es in diejenigen Lymphbahnen, welche die Abfuhr von der inficirten Wunde besorgen, kommt.

Fassen wir die experimentellen Ergebnisse dieser Versuche kurz zusammen, so ergibt sich Folgendes:

Antitoxisches Hundeserum, einem Hunde intravenös beigebracht, vertheilt sich zwischen Blut und Lymphe nicht wesentlich anders, als wenn man antitoxisches Pferdeserum injicirt hätte. In beiden Fällen findet nach einiger Zeit eine Ausgleichung statt, wobei etwa zweimal so viel Antitoxin in dem Blute zurückbleibt, als in die Lymphe übergeht.

Das Tetanustoxin sowohl wie das Antitoxin werden nach subcutaner Injection zunächst in die Lymphbahn aufgenommen und erreichen auf diesem Wege die Blutbahn. Direkt aus dem subcutanen Gewebe werden Toxin und Antitoxin nicht oder nur in verhältnissmässig kleinen Mengen in die Blutbahn aufgenommen.

Die Ueberführung des Tetanusgiftes mittelst der Lymphe aus dem subcutanen Gewebe in die Blutbahn geschieht mit bemerkenswerther Langsamkeit.

Ist das Tetanusgift schon in der Lymphe und in dem Blute verbreitet, so wird es durch nachträglich injicirtes Antitoxin in der Lymphe ebensowohl wie im Blute schnell neutralisirt.

Druck von M. DuMont-Schauberg, Strassburg i. E.

HOPPE-SEYLER'S ZETTSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof.
O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. F. HOFMEISTER in Strassburg,
Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof.
HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Prof. E. LUDWIG in
Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. C. A. PEKELHARING
in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in
Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

A. KOSSEL,

Professor der Physiologie in Marburg.

DREISSIGSTER BAND.

Mit zwei Tafeln und vier Abbildungen.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1900.

Inhalt des dreissigsten Bandes.

HEFT I und II.

(Ausgegeben am 18. August 1900.)

Seite

Schütz, Julius. Zur Kenntniss der quantitativen Pepsinwirkung .	1
Blum, Leon. Ueber den Nährwerth der Heteroalbumose des Fibrins und der Protoalbumosen des Caseins	15
Petry, Eugen. Ueber die Ausscheidung von leicht abspaltbarem Schwefel durch den Harn	45
Maas, Otto. Ueber die ersten Spaltungsprodukte des Eiweisses bei Einwirkung von Alkali	61
Pfaundler, Meinhard. Ueber ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harne	75
— — Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung . .	90
Sieber, N. Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch .	101
Panzer, Theodor. Zur Kenntniss der menschlichen Chylusflüssigkeit	113
Bouma, Jac. Ueber die bei der Behandlung des Harnindicans mit Ferrichloridsalzsäure auftretenden rothbraunen Farbstoffe .	117
Zeynek, Rich. v. Ueber das durch Pepsinsalzsäure aus Oxyhämoglobin entstehende Hämatin und Hämochromogen. Mit einer Abbildung	126
Jacoby, Martin. Ueber das Aldehyde oxydirende Ferment der Leber und Nebenniere	135
— — Ueber die fermentative Eiweisssspaltung und Ammoniakbildung in der Leber	149
— — Ueber die Beziehungen der Leber- und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse	174
Spiro, K. Ueber die Beeinflussung der Eiweisscoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen	182
Magnus-Levy, Adolf. Ueber den Bence-Jones'schen Eiweisskörper .	200

HEFT III, IV und V.

(Ausgegeben am 22. September 1900.)

Schulze, E. Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze. Zweite Abhandlung	241
Naegeli, Otto. Zur Aciditätsbestimmung des Urins	313
His d. J., W., und W. Hagen. Kritische Untersuchungen über den Nachweis von Harnsäure und Purinbasen im Blut und in thierischen Organen	350
Nenecki, M., und J. Zaleski. Untersuchungen über den Blutfarbstoff. I. Ueber die Aether des Hämins. Mit einer Tafel und drei Abbildungen. — II. Zur Kenntniss des Hämatoporphyrins	384

	Seite
Erben, F. Die chemische Zusammensetzung menschlichen Chylusfettes	436
Habermann, J., und R. Ehrenfeld. Ueber Proteinstoffe	453
Goto, M. Ueber die Lösung der Harnsäure durch Nucleinsäure und Thyminsäure	473
Salkowski, E. Ueber die Gährung der Pentosen	478

HEFT VI.

(Ausgegeben am 20. Oktober 1900.)

Burow, Rob. Der Lecithingehalt der Milch und seine Abhängigkeit vom relativen Hirngewichte des Säuglings	495
Bang, Ivar. Bemerkungen über das Nucleohiston	508
Kossel, A. Bemerkungen zu der vorhergehenden Abhandlung des Herrn Ivar Bang	520
Gulewitsch, Wl. Zur Frage nach dem Chemismus der vitalen Harnstoffbildung. I. Einleitung	523
— — und A. Joehelsohn. Zur Frage nach dem Chemismus der vitalen Harnstoffbildung. II. Ueber das Vorkommen von Arginin in der Milz	533
Steudel, H. Ueber die Constitution des Thymins	539
Wörner, Emil, und H. Thierfelder. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des Gehirns. Mit einer Tafel	542
Fenyvessy, Béla. Ueber das Schicksal einiger isomeren Oxychinoline (Carbostyryl und Kynurin) im Thierkörper	552
Gulewitsch, Wl., und S. Amiradžibi. Zur Kenntniss der Extractivstoffe der Muskeln	565

Zur Kenntniss der quantitativen Pepsinwirkung.

Von

cand. med. **Julius Schütz** (aus Wien).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 27.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Im Jahre 1885 hat **Emil Schütz**¹⁾ nachgewiesen, dass die Mengen der in einer bestimmten Zeit gebildeten peptischen Verdauungsprodukte unter sonst gleichen Verhältnissen innerhalb bestimmter Grenzen den Quadratwurzeln aus den relativen Pepsinmengen gerade proportional sind.

Als Maass der Verdauungsprodukte nahm er die Grösse ihrer Linksdrehung an und beurtheilte darnach die Menge des «Peptons». Dieser Befund blieb längere Zeit wenig beachtet. Zum Theil begegnete er lebhaftem Misstrauen.²⁾ Sechs Jahre später veröffentlichte dann **Borissow**³⁾ Untersuchungen über die quantitative Wirkung des Pepsins. Er bediente sich bei seinen Versuchen der Methode von **Mett**,⁴⁾ welche ihren Grundzügen nach in Folgendem besteht: Hühnereiweiss wird in Glascapillaren von 1—2 mm. Lichtung eingesogen und durch Erhitzen coagulirt. Die Capillaren werden in Stückchen von 1—2 cm. Länge zerschnitten und 10 Stunden lang bei Bruttemperatur in der Verdauungsflüssigkeit gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Länge der gelösten Eiweissssäule mit Hülfe einer Lupe gemessen. **Borissow** kam nun zu dem bemerkenswerthen Resultat, dass die Längen der verdauten Eiweissssäulen sich verhielten wie die Quadratwurzeln aus den

1) Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 577.

2) Vgl. sp. **Maly's** Jahresberichte, Bd. XV, S. 266 u. Bd. XIV, S. 291.

3) Inaug.-Dissertation. Petersburg, 1891. (Russisch), citirt nach **Ssamoilow**. (Archives de sciences biologiques, Bd. II, S. 705.)

4) **Mett**, Contribution à l'innervation de la glande sous-stomacale. Petersburg 1889. (Russisch), citirt nach **Ssamoilow** l. c.

angewandten Pepsinconcentrationen. Es waren demnach sowohl E. Schütz wie Borissow, trotzdem sie mit verschiedenen Methoden gearbeitet hatten und von verschiedenen Maasseinheiten ausgegangen waren, zu demselben Resultate gelangt.

Die Ergebnisse beider Arbeiten ermöglichten es, Methoden zur Bestimmung der relativen Pepsinmengen auszuarbeiten.¹⁾ Praktische Verwerthung von anderer Seite erfuhr vor Allem das Mett'sche Verfahren, nach welchem Pawlow einen Theil seiner bedeutungsvollen Untersuchungen über den Fermentgehalt der Verdauungsflüssigkeiten ausgeführt hat.²⁾

Obgleich nun die empirisch gefundenen Resultate zur Begründung einer Methode vollauf berechtigten, so bietet doch ihre theoretische Deutung Schwierigkeiten. Zur Zeit, als die Arbeit von E. Schütz erschien, war es noch nicht bekannt, dass bei der Pepsinverdauung eine grössere Anzahl von Produkten, deren Eigenschaften, namentlich auch in Bezug auf ihr optisches Drehungsvermögen, zum grossen Theil noch unbekannt sind, neben einander entstehen, wie dies zuletzt eingehend durch die Untersuchungen von E. P. Pick³⁾ und Zunz⁴⁾ gezeigt worden ist. Es blieb daher bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse die Frage offen, ob man berechtigt ist, für das mit dem Gang der Verdauung sich fortwährend ändernde Gemenge der peptischen Spaltungsprodukte eine einheitliche spezifische Drehung anzunehmen und dieselbe als Maass des verdauten Eiweisses zu betrachten. Ja, man konnte die Vermuthung hegen, dass die Schütz'sche Regel nicht der Ausdruck einer verminderten Peptonbildung sei, sondern nur dadurch bedingt, dass bei fortschreitender Verdauung schwächer optisch wirkende Spaltungsprodukte gebildet werden. Was die Methode von Mett betrifft, so ist dieselbe nur dann anwend-

¹⁾ Vgl. z. B. E. Schütz, Prager Zeitschrift für Heilkunde, 1884, S. 401.

²⁾ Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Deutsch von A. Walther. J. F. Bergmann. Wiesbaden, 1898.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 246 und Bd. XXVIII, S. 219.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 219 und Bd. XXVIII, S. 132.

bar, wenn das Ferment auf geronnenes Eiweiss wirkt, und es fehlt der Nachweis, dass die so gewonnenen Ergebnisse auch für gelöste Eiweisskörper zutreffen. Sowohl E. Schütz wie Borissow geben an, dass nach Erreichung einer bestimmten Pepsinconcentration die Regel nicht mehr gilt.

Es war nun von oben erwähnten Gesichtspunkten aus erwünscht, zu prüfen, ob sich die angegebene Gesetzmässigkeit auch dann ergibt, wenn man unter Anwendung von flüssigem Eiweiss ein unbestreitbares, sich stets gleichbleibendes Maass für die Menge des verdauten Eiweisses einführt, und ob das Versagen der Gesetzmässigkeit wirklich auf einer Abschwächung der Fermentwirkung beruht und nicht möglicher Weise auf erschwerter Diffusion (bei der Mett'schen Versuchsanordnung) oder auf einer Veränderung der specifischen Drehung (bei der Versuchsanordnung von E. Schütz.) Zur Aufklärung dieser Verhältnisse habe ich auf Veranlassung von Herrn Professor Hofmeister die mitzutheilenden Versuche ausgeführt.

Zur Versuchsanordnung.

Im Hühnereiweiss sind drei Arten stickstoffhaltiger Substanzen vorhanden:

1. das Gemenge von echten Eiweisskörpern: krystallisiertes Ovalbumin, amorphes Albumin und Globulin;
2. ein durch Kochen nicht fällbarer Eiweisskörper, von Mörner Ovomuroid genannt;
3. geringe Mengen von nicht eiweissartigen Substanzen, vor Allem von Lecithin.

Der Einfachheit halber sei der Stickstoff der ersten Art von Körpern «coagulabler Stickstoff», derjenige der zweiten und dritten «nicht coagulabler Stickstoff» genannt.

Bei der Verdauung findet eine fortwährende Abnahme des coagulablen, einhergehend mit einer Zunahme des nicht coagulablen Stickstoffs statt, da die Verdauungsprodukte, abgesehen von dem als Zwischenprodukt auftretenden und mit dem genuinen Eiweiss bei Neutralisation ausfallenden Acidalbumin, durch Hitze nicht gefällt werden.

Um nun die Menge der gebildeten Spaltungsprodukte zu bestimmen, kann man entweder die erste oder die zweite der genannten Veränderungen bestimmen und gewinnt auf diese Weise ein unveränderliches Maass für den Umfang der Pepsinwirkung. Aus praktischen Gründen empfahl es sich, die Zunahme des nicht coagulablen Stickstoffs zu ermitteln, da in diesem Falle eine Bestimmung in aliquoten Theilen ermöglicht ist. Ob überhaupt und inwieweit das Mucoid bei dieser Versuchsanordnung der peptischen Spaltung unterliegt, ist nicht untersucht, kommt übrigens ebensowenig wie der relative Antheil, den die einzelnen Eiweisskörper an der Bildung der Verdauungsprodukte haben, für die Frage nach der empirischen Gültigkeit der E. Schütz'schen Regel in Betracht.

Um für die einzelnen Versuchsreihen einen ungefähren Vergleichsmaassstab zu haben, wurde von vornherein eine grössere Quantität Pepsinlösung hergestellt: 2 g Pepsinum purissimum (Grübler) wurden in einem Liter 0,25 %iger Salzsäure gelöst. Die Lösung erwies sich als für meine Zwecke sehr stark wirksam und konnte monatelang, ohne zu faulen oder an Wirksamkeit einzubüssen, im Eiskasten aufbewahrt werden. Für die Verdauungsversuche wurden einige Cubikcentimeter im bestimmten Verhältniss (1 : 40, 1 : 50) mit destillirtem Wasser verdünnt und jedesmal 1 ccm. der so entstandenen verdünnten Lösung für den jeweiligen Versuch als Maass der Pepsinmenge benützt.

Als Ausgangsmaterial diene Hühnereiweiss. Das vom Dotter sorgfältig getrennte Eiereiweiss wurde durch Schlagen zu Schaum und Absitzenlassen im Eiskasten in bekannter Weise von Chalazen und Membranen befreit. Von zwölf Eiern konnten 150—200 ccm. klare Eiweisslösung erhalten werden. Die Verdauungsversuche wurden im Ganzen in der von E. Schütz angegebenen Weise ausgeführt.

Je 10 ccm. der Eiweisslösung (etwa einem Gehalt von 1—1,2 g coagulablen Eiweisses entsprechend) wurden mit einer bestimmten Menge Pepsinlösung, 29 ccm. 1 %iger Salzsäure versetzt und mit destillirtem Wasser auf 100 ccm. aufgefüllt. Die einzelnen Verdauungsproben hatten somit gleichen Eiweiss-

und Säuregehalt¹⁾) und waren nur in Bezug auf den Pepsin-gehalt verschieden. Die Proben wurden gut verkorkt, in einem Brutofen meist bei 37—40° 15—16 Stunden stehen gelassen, hierauf mit Natriumcarbonat soweit neutralisirt, dass sie auf Congopapier neutral, auf Lackmus schwach sauer reagirten. Sie enthielten dann keine freie Salzsäure mehr, die saure Reaction rührte nur von sauren Phosphaten her. Auf diese Weise konnte eine Ueberneutralisation mit ihren Gefahren vermieden werden. Die Proben wurden dann in den Eisschrank gestellt und der Reihe nach verarbeitet.

Was die Trennung des coagulablen Stickstoffs vom nicht coagulablen betrifft, so wurde in einer Anzahl der Versuchsreihen folgendermassen vorgegangen:

Die Proben wurden quantitativ in eine Porzellanschale gespült, mit genau abgemessenen gleichen Mengen sehr verdünnter Essigsäure versetzt, unter fortwährendem Umrühren allmählich zum Sieden erhitzt, nach dem Erkalten mit $\frac{1}{10}$ Normal-lauge genau neutralisirt und filtrirt. Der Niederschlag wurde zwei- bis dreimal mit heissem Wasser verrieben; Filtrate und Waschwasser wurden vereinigt.

Bei einem Theile der Versuchsreihen wurde diese gebräuchliche Methode in der Weise modificirt, dass die von den sauren Phosphaten herrührende saure Reaction nicht durch Essigsäure verstärkt wurde, sondern durch Zusatz einer 2%igen Lösung von Monokaliumphosphat — meist 5 ccm. Es fiel dadurch die Neutralisation nach dem Kochen fort; zugleich konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass beim Kochen mit sehr stark verdünnter Essigsäure keine Eiweisspaltung eintritt, weil einerseits beide Arten des Verfahrens gleich gut mit einander stimmende Kontrollwerthe gaben, andererseits das saure Phosphat coagulirtes Eiweiss beim kurzen Kochen nicht verändert.

In nicht weiter ausgeführten Vorversuchen habe ich zunächst die die meisten Schwierigkeiten bietende Abscheidung des Eiweisses auf dem

1) Derselbe betrug 0,25 %, da 4 ccm. 1 %iger Salzsäure erfahrungsgemäss zur Abstumpfung der natürlichen Alkalescenz des Hühnereiweisses verbraucht werden.

Wege zu erzielen gesucht, dass ich die Verdauungslösung mit Zinksulfat versetzte, mit Natronlauge neutralisirte und nach Zusatz einer kleinen Messerspitze von Zinkoxyd kochte. Dabei resultirte bald eine klare und von Resten des coagulablen Eiweisses sicher freie Flüssigkeit. Allein der Vergleich der Stickstoffwerthe zeigte, dass dabei ähnlich, wie dies schon Hofmeister¹⁾ für das Füllen mit Ferriacetat gezeigt hat, kleine Mengen Albumosenstickstoffs in den Niederschlag eingehen. Als sich die Bemühungen, diesen Fehler auszuschalten, oder wenigstens constant zu gestalten, vergeblich erwiesen, habe ich für vorliegende Versuche das für manche andere Zwecke sehr empfehlenswerthe Verfahren aufgegeben und bin zur einfachen Coagulation zurückgekehrt.

Die durch Coagulation erhaltenen Flüssigkeiten enthielten den nicht coagulablen Stickstoff der betreffenden Verdauungsprobe. Derselbe wurde nach Kjeldahl bestimmt. Um daraus die Menge des peptisch gespaltenen Eiweisses berechnen zu können, musste die Menge des im nativen Eiweiss enthaltenen nicht coagulablen Stickstoffs davon abgezogen werden. Derselbe wurde auch für jede Versuchsreihe besonders bestimmt, doch ist zu bemerken, dass es sich dabei um eine erstaunlich constante Grösse handelt. Sie wurde nämlich stets zu 0,024 bis 0,026 g auf 10 ccm. Eiweisslösung gefunden; nur in zwei Fällen (bei im Frühjahr gelegten Eiern) fand sich 0,0218 bzw. 0,0226 g von vornherein nicht coagulabler Stickstoff.

Versuche.

In den nachstehend mitgetheilten Versuchsreihen sind die Pepsinmengen in Cubikcentimetern der oben angeführten Pepsinverdünnung angegeben. Da, wo sehr grosse Mengen Pepsin gewählt wurden, habe ich des Vergleiches wegen die Bezeichnung beibehalten, obgleich in diesen Fällen, um das Gesamtvolumen der Probe nicht zu ändern, statt der verdünnten Pepsinlösung eine entsprechende Menge der viel concentrirteren Ausgangsflüssigkeit zugesetzt wurde.

Die für den in Lösung gegangenen Eiweissstickstoff unter »gefunden« angeführten Zahlen sind ein Mittel aus je zwei oder drei Parallelbestimmungen. Um ein Urtheil über die Grösse der Versuchsfehler zu ermöglichen, führe ich in der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 58.

ersten und dritten Tabelle die gefundenen Einzelwerthe neben den Mittelzahlen an. Die unter «berechnet» angeführten Werthe geben die Zahlen, welche verlangt sind, wenn man für 1—16 ccm. meiner verdünnten Pepsinlösung die strenge Gültigkeit der E. Schütz'schen Regel annimmt. Sie wurden so berechnet, dass die Summe der für 1, 4, 9 und 16 ccm. Pepsin gefundenen Mittelzahlen durch die Summe von $\sqrt{1} + \sqrt{4} + \sqrt{9} + \sqrt{16} = 10$ getheilt wurde, womit sich der für 1 ccm. Pepsin entfallende Ausgangswerth ergibt. Diese Berechnung beruht auf der von mir gemachten Erfahrung, dass die E. Schütz'sche Regel unter den von mir eingehaltenen Bedingungen nur bis zu einem Pepsingehalt von 16 ccm. gilt.

Versuchsreihe I.

Verdünnung der Pepsinlösung: 1 : 50.

Verdauungsdauer: 15 Stunden.

Temperatur: 38°.

Pepsinmenge ccm.	Verdauter Stickstoff in g	
	Gefunden	Berechnet
1	0,0185	Mittel 0,0212 0,0213
	0,0221	
	0,0230	
4	0,0437	Mittel 0,0471 0,0426
	0,0506	
9	0,0683	Mittel 0,0652 0,0639
	0,0633	
	0,0640	
16	0,0786	Mittel 0,0799 0,0852
	0,0796	
	0,0815	
25	0,0958	Mittel 0,0935 0,1065
	0,0913	
36	0,1010	Mittel 0,1031 0,1278
	0,1052	

Versuchsreihe II.

Verdünnung der Pepsinlösung 1 : 50.

Verdauungsdauer: 15 ³/₄ Stunden.

Temperatur: 38°.

Pepsinmenge ccm.	Verdauter Stickstoff in g	
	Gefunden	Berechnet
1	0,0219	0,0229
4	0,0425	0,0458
9	0,0707	0,0688
16	0,0943	0,0917

Versuchsreihe III.

Verdünnung der Pepsinlösung: 1 : 40.

Verdauungsdauer: 15 Stunden.

Temperatur: 37°.

Pepsinmenge ccm.	Verdauter Stickstoff in g	
	Gefunden	Berechnet
1	0,0220	Mittel 0,0230 0,0223
	0,0230	
	0,0241	
4	0,0425	Mittel 0,0427 0,0446
	0,0428	
	0,0692	
9	0,0673	Mittel 0,0686 0,0669
	0,0919	
	0,0939	
16	0,0810	Mittel 0,0889 0,0892

Versuchsreihe IV.

Verdünnung der Pepsinlösung: 1 : 40.

Verdauungsdauer 15 Stunden.

Temperatur: 32°.

Pepsinmenge ccm.	Verdauter Stickstoff in g	
	Gefunden	Berechnet
1	0,0210	0,0204
16	0,0810	0,0816
49	0,1298	0,1438

Durch obige Tabellen ist neuerdings die Gültigkeit der E. Schütz'schen Regel dargethan; die Uebereinstimmung der auf drei ganz verschiedenen Wegen: von E. Schütz polarimetrisch, von Borissow durch Messung der Eiweissssäulen, von mir durch Stickstoffbestimmungen erhaltenen Resultate lässt daran keinen Zweifel übrig.

In Uebereinstimmung mit E. Schütz und Borissow ergibt es sich, dass die Regel über eine bestimmte Pepsin-concentration hinaus nicht mehr gilt, und zwar nach meinen Erfahrungen, sobald in der Versuchszeit etwa die Hälfte des vorhandenen coagulablen Eiweisses verdaut ist. (Tabelle I und IV.)¹⁾

Um nun festzustellen, wie sich die Spaltung bei relativ sehr hohem Pepsingehalt verhält, habe ich noch folgende Versuchsreihe ausgeführt.

Es wurden Proben mit den Pepsinconcentrationen 49, 64, 100 gewonnen, 15 Stunden lang bei 38° stehen gelassen, hierauf in gewöhnlicher Weise sofort verarbeitet. (Versuchsreihe Vb.) Daneben andere Proben von der Concentration 49 ebenso lang stehen gelassen, dann eine Anzahl davon durch Zusatz von 5 ccm. concentrirter Pepsinlösung auf die Concentration 249 gebracht und mit den übrigen ohne Zusatz gebliebenen weitere 24 Stunden der Verdauung überlassen. Die Resultate sind aus untenstehenden Tabellen zu ersehen. Die Zahlen sind das Mittel aus zwei oder drei Verdauungsproben.

¹⁾ Die Menge des coagulablen Stickstoffs in 10 ccm. Hühnereiweiss beträgt nach eigenen Bestimmungen etwa 0,170—0,175 g.

Versuchsreihe V.

Verdünnung der Pepsinlösung: 1 : 40.

Temperatur: 37,5—38,5°.

a) Dauer 15 Stunden.

Pepsinmenge ausgedrückt in ccm.	Verdauter Stickstoff in g
49	0,1360
64	0,1492
100	0,1534

b) Dauer 15 + 24 Stunden.

Pepsinmenge ccm.	Verdauter Stickstoff in g
49	0,1532
249	0,1615 — 0,0035 = 0,15801)

Es ergibt sich daraus, wie auch schon aus früheren Befunden, dass bei sehr hohen Concentrationen ein Zuwachs an Pepsingehalt nur ein verhältnissmässig geringes Zunehmen des in Lösung übergehenden Stickstoffs bewirkt.

Wenn man die Resultate sämtlicher Versuchsreihen graphisch darstellt, indem man die relativen Pepsinmengen als Abscissen, die Zahlen für den verdauten Stickstoff als Ordinaten aufträgt, so ergibt sich eine Curve, welche, soweit die E. Schütz'sche Regel gilt, eine Parabel ist, bei höheren Concentrationen aber allmählich in eine zur Abscissenachse parallele Gerade übergeht. Der Grund dieser Abweichung liegt darin, dass bei der gewählten Versuchsanordnung die Menge des angreifbaren Eiweisses bei höherem Pepsingehalt entsprechend geringer wird. Es geht dies klar daraus hervor,

1) 400 ccm. der 40fach verdünnten Pepsinlösung enthielten 0,0056 g N.

dass beim Mett'schen Verfahren, wo in Folge der Versuchsbedingungen eine Verminderung der disponiblen Eiweissmenge — d. h. der angreifbaren Eiweissfläche — nicht erfolgt, die Regel für viel höhere Concentrationen nachweisbar ist.

Ich habe dies durch Vergleichsversuche mit dem Verfahren von Mett zeigen können. Dabei ergab sich zunächst, dass das Verfahren für so geringe Pepsinconcentrationen, wie sie bei den oben angeführten Versuchen benutzt wurden, (1—49 ccm. $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{50}$ Pepsinlösung auf 100 ccm. Gesamtfüssigkeit) keinen sicher messbaren Verdauungseffect hatte. Ich ging daher von der unverdünnten Pepsinlösung aus.

Versuchsreihe VI.

Unverdünnte Pepsinlösung.

Temperatur: 38°.

Verdauungsdauer: 11 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Pepsinmenge ccm. in 100	Länge der verdauten Eiweissssäule in mm.	
	Gemessen ¹⁾	Berechnet
1	0,45	0,46
4	0,99	0,91
9	1,25	1,37
16	1,87	1,82
25	2,08	2,28
36	2,14	2,74
49	2,50	3,19
64	2,64	3,65

Wie man sieht, gilt die E. Schütz'sche Regel hier bis zu einem Gehalt von 16 ccm. der unverdünnten Pepsinlösung auf 100 ccm. Gesamtvolumen, d. h. 40—50 Mal höher, als sich ihre Gültigkeit bei meiner Anordnung zeigen liess; somit gilt die Regel für Concentrationen, in Cubikcentimetern meiner verdünnten Pepsinlösung ausgedrückt von 1—800, also innerhalb

¹⁾ Es wurde nur die von einem Ende her verdaute Eiweissssäule gemessen. Die Zahlen bilden das Mittel aus einigen Ablesungen.

sehr weite Grenzen. Die Regel dürfte danach auch für andere Concentrationen oberhalb und unterhalb Gültigkeit haben, und es liegt wohl nur an den Versuchsbedingungen, wenn sie sich nur innerhalb der angegebenen Grenzen nachweisen liess. So in der Versuchsanordnung nach E. Schütz an der Abnahme des zur Verfügung stehenden Eiweisses und an der allmählichen Sättigung der Pepsinlösung mit Verdauungsprodukten, bei der Anordnung von Mett an dem letzteren Moment und an den Schwierigkeiten, welche sich beim Schwinden der Eiweissssäule in der engen Glasröhre dem Wegdiffundiren der Verdauungsprodukte entgegensetzen.

Der Umstand, dass das Hühnereiweiss eigentlich ein Gemenge von einigen Eiweisskörpern ist, machte es wünschenswerth, die Versuche auch mit reinen Eiweisskörpern zu wiederholen. Ich verwendete hierzu krystallisirtes Serumalbumin und krystallisirtes Edestin. Es ergaben sich jedoch bei der Coagulation der Verdauungslösung Schwierigkeiten, indem sich bei einer Anzahl von Proben zu geringe Uebereinstimmung der Kontrollbestimmungen ergab. Es wurde daher vorläufig von der Weiterführung der Versuche Abstand genommen. Doch machen es die mir vorliegenden Bestimmungen, welche ein Mittel zu ziehen gestatten, sehr wahrscheinlich, dass die Regel auch für homogene, reine Eiweisskörper gilt.

Die Gültigkeit der Schütz'schen Regel durch neue Versuche sicherzustellen, schien mir schon deshalb nicht überflüssig, weil noch immer Methoden zur Bestimmung der relativen Pepsinmengen ausgearbeitet werden, welche auf der stillschweigenden Annahme beruhen, zwischen Concentration des Pepsins und seiner quantitativen Wirksamkeit bestehe eine einfache Proportionalität. Derartige Methoden mögen für Untersuchungen, bei denen es sich darum handelt, festzustellen, ob die eine Pepsinlösung überhaupt stärker wirkt als die andere, brauchbar sein. Für einen quantitativen Schluss auf die Menge des vorhandenen Ferments sind sie nicht geeignet.

Für praktische Zwecke dürfte das Mett'sche Verfahren, wo es sich um concentrirte Pepsinlösungen handelt, wie sie

z. B. Pawlow im reinen Magensaft von Hunden zur Verfügung standen, bei seiner Eleganz und bequemen Ausführbarkeit vollkommen genügen. Für klinische Untersuchungen, wo meist gerade verdünnter Magensaft vorliegt, dürfte es freilich nicht zureichen, ja es könnte, wie meine Versuche gezeigt haben, insofern zu falschen Schlüssen führen, als es bei geringem Pepsingehalt ganz negative Resultate gibt, wo das Verfahren von E. Schütz und mir gut bestimmbare Werthe liefert.

Es ist einleuchtend, dass sich das Verfahren in der von mir gegebenen oder einer zweckmässig vereinfachten Form auch für klinische Untersuchungen eignet. Aber auch das Verfahren von Mett lässt sich wohl nach meinen Erfahrungen durch Wahl eines der Pepsinwirkung zugänglicheren Eiweisskörpers der Praxis dienstbar machen. Doch hätte dies neuerliche umfassende Untersuchungen nöthig gemacht, denen ich im Augenblick nicht näher treten kann.

Pawlow¹⁾ gibt an, dass die E. Schütz'sche Regel auch für die Wirkung des Trypsins, des Steapsins und Ptyalins Gültigkeit besitzt. Sollte sich dies bestätigen, so hätten wir es mit einer bei spaltenden Fermenten verbreiteten Gesetzmässigkeit zu thun. Das Bedürfniss nach Aufklärung der ihr zu Grunde liegenden Bedingungen ist daher begreiflich.

Wie oben erwähnt, ist Schütz's Beobachtung vielfach auf Misstrauen gestossen, so weit ersichtlich aus dem Grund, weil sie dem Princip der einfachen Proportionalität chemischer Wirkungen widerspricht. Vermuthlich ist dieser Widerspruch nur ein scheinbarer. Herr Professor Hofmeister macht mich nämlich auf die formale Aehnlichkeit aufmerksam, welche zwischen der Schütz'schen Regel und dem Verhalten gelöster, in geringem Umfang dissociirter Substanzen besteht. Nach den Gesetzen der Dissociation ist bei constanter Temperatur die Concentration der dissociirten Moleküle bei geringfügiger Dissociation proportional der Quadratwurzel aus der Gesamtkonzentration.²⁾ Stellt man sich nun vor, dass das Pepsin

¹⁾ A. a. o. S. 33 ff.

²⁾ Vgl. Nernst, Theoretische Chemie S. 367.

bei Abwesenheit von Wasser nicht wirksam ist, wohl aber bei Lösen in Wasser zum geringen Theil in zwei Complexe zerfällt, von denen einer, ähnlich den Wasserstoffionen der Säuren bei der Spaltung des Rohrzuckers, katalytisch wirksam ist, so erscheint die Schütz'sche Regel einfach als der Ausdruck der Dissociationsformel für den Fall geringfügiger Dissociation.

Umgekehrt kann auch die Beobachtung Medwedew's,¹⁾ wonach die Wirkung des oxydativen Fermentes mit dem Quadrat der Concentration steigt, als der Ausdruck der Dissociationsformel für den Fall weitgehender Dissociation angesprochen werden, wobei die Concentration der nicht dissociirten Moleküle dem Quadrat der Gesamtconcentration proportional ist. In diesem Falle wäre, umgekehrt als wie bei der Pepsinwirkung, die Fermentwirkung (Sauerstoffübertragung) an die nicht dissociirten Moleküle gebunden zu denken.

Herr Professor Hofmeister hat die eingehende Prüfung dieser Auffassung, sowie überhaupt der daran sich knüpfenden Vorstellung, dass die «Fermente» dissociirbare organische Complexe sind, für weitere Untersuchungen in Aussicht genommen.

1) Pflüger's Archiv 65, 270.

Ueber den Nährwerth der Heteroalbumose des Fibrins und der Protoalbumosen des Caseins.

Von

Cand. med. **Leon Blum** (aus Mülhausen i. E.)

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg, Neue Folge Nr. 28.)
(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

I.

Die letzten Jahre haben mit zunehmender Sicherheit den Nachweis gebracht, dass die isolirten reinen Eiweisssubstanzen viel tiefer gehende chemische Verschiedenheiten aufweisen, als man früher anzunehmen geneigt war. Hatten schon ältere und neuere Untersuchungen ergeben, dass die Menge der durch Spaltung aus bestimmten Eiweisskörpern erhältlichen Endprodukte, des Tyrosins, Leucins, der Glutaminsäure, Asparaginsäure, des Arginins u. s. w., bei Weitem nicht gleich gross ist, so haben Erfahrungen aus jüngster Zeit noch grössere Verschiedenheiten im Betreff des Gehalts an Glycosamin- und Glycollgruppen ergeben, und durch die Methoden von F. N. Schulz¹⁾ einerseits, von E. Schulze²⁾ und W. Hausmann³⁾ andererseits ist es gelungen, über die Verschiedenheit der Schwefel- und der Stickstoffbindung einen quantitativen Aufschluss zu

1) F. N. Schulz, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss, Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. XXV, S. 16.

2) E. Schulze, Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. XXIV, S. 276 u. Bd. XXV, S. 360.

3) W. Hausmann, Ueber die Vertheilung des Stickstoffes im Eiweissmolekül. Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. XXVII, S. 95 u. Bd. XXIX, S. 136.

gewinnen, welcher zwar noch keinen genügenden Einblick in die Constitution der Eiweisskörper bietet, aber die grossen Unterschiede zwischen ihnen mit genügender Klarheit hervortreten lässt. Zu einem ähnlichen Ergebniss haben weiter die Bemühungen zur Isolirung und besseren Charakterisirung der näheren Spaltungsprodukte des Eiweisses, der Albumosen und Peptone geführt. Obgleich diese Untersuchungen noch lange nicht abgeschlossen sind, so haben sie doch schon ergeben, dass die bei Pepsinverdauung aus Fibrin entstehenden Albumosen¹⁾ zum Theil verschieden sind von den aus Serumglobulin²⁾ und aus Casein³⁾ erhaltenen, und Erfahrungen, welche Dr. Baer und ich bei der Pepsinverdauung von Edestin und Hämoglobin zu sammeln Gelegenheit hatten,⁴⁾ haben zur Auffindung neuer, diesen Substanzen eigenthümlicher Albumosen geführt.

Diese Thatsachen legen die Frage nahe, ob man die Substanzen der Eiweissgruppe, auch wenn man sich an die typischen Vertreter der «echten» coagulablen Eiweisskörper hält, als physiologisch gleichwerthig ansehen darf. Hausmann hat diese Frage verneinend beantwortet. Er sagt am Schlusse seiner Mittheilung: «Der allgemeine Brauch, bei Beurtheilung von Stoffwechselvorgängen Eiweissarten verschiedener Herkunft einfach gleichzusetzen, ist sonach, streng genommen, unrichtig», und weiter: «Es ist wohl als ausgeschlossen anzusehen, dass Proteinstoffe von so grosser Verschiedenheit der Stickstoffvertheilung sich physiologisch in jeder Beziehung ersetzen können.» Was aber für das ganze Eiweissmolekül gilt, muss um so mehr

1) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXIV, S. 246. Derselbe, Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XXVIII, S. 219.

2) F. Ueber, Die Spaltung des krystallinischen Eiweiss- und Serumalbumins sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung. Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 258.

3) F. Alexander, Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 411.

4) Ueber diese soll in einer späteren Mittheilung kurz berichtet werden.

für seine nächsten Spaltungsprodukte Gültigkeit haben, da dieselben nachweislich nicht alle Elementargruppen des ursprünglichen Moleküls und nicht in demselben quantitativen Verhältniss zu enthalten brauchen. Hierdurch wird aber eine bedeutungsvolle physiologische Frage nahe gelegt, da nur in den seltensten Fällen die mit der Nahrung aufgenommenen Eiweisskörper als solche zur Resorption gelangen, vielmehr vorzugsweise in Form ihrer primären und secundären Abbauprodukte.

Von den physiologischen Functionen der aufgenommenen Nährstoffe ist ihre Leistung im Gesamtstoffwechsel am besten der Untersuchung zugänglich. In der That fehlt es nicht an einschlägigen Untersuchungen, die mit «Peptonen» (im alten Sinn) oder «Albumosen» vorgenommen wurden, und welche mit grösserer oder geringerer Sicherheit zeigen, dass das Eiweiss durch nicht allzuweit abstehende Verdauungsprodukte ersetzt werden kann. Leider sind sie nahezu sämmtlich mit Gemengen angestellt, so dass aus ihnen eigentlich mit Sicherheit nur hervorgeht, dass es wenig Unterschied macht, ob ein Eiweisskörper als solcher oder die Summe der aus ihm durch nicht zu weitgehende Verdauung hervorgegangenen Produkte eingeführt wird. Eine grössere Beweiskraft kann man wenigstens den einschlägigen Versuchen von Maly,¹⁾ Plósz und Gyergyai,²⁾ Adamkiewicz³⁾ und Ellinger,⁴⁾ bei denen Gemenge von Fibrinalbumosen in Verwendung kamen, nicht beimessen. Von den Fütterungsversuchen ähnlicher Art, die mit auf anderem Wege als Pepsin- und Trypsinverdauung hergestellten Albumosen und Peptonen angestellt worden sind (Gerlach, Zuntz, Deiters, I. Munk, Hildebrandt, Neumeister u. A.), muss hier abgesehen werden. Der ernsthafte Versuch, den Nähr-

1) Maly, Ueber die chemische Zusammensetzung und die physiologische Bedeutung der Peptone. Pflüger's Archiv, Bd. IX, S. 585.

2) Plósz und Gyergyai, Ueber Peptone und Ernährung mit denselben. Pflüger's Archiv, Bd. X, S. 536.

3) Adamkiewicz, Ueber die Natur und den Nährwerth des Peptons, 1877.

4) Ellinger, Ernährungsversuche mit Drüsenpepton. Zeitschrift f. Biologie, 1896, Bd. XV, S. 201.

werth isolirter Verdauungsprodukte zu untersuchen, ist zuerst von Pollitzer¹⁾, dann von Ellinger²⁾ gemacht worden.

Leider können Ellinger's Versuche für die vorliegende Frage nicht verworthen werden, da sich herausgestellt hat, dass das von ihm als relativ einheitliches Produkt angesehene «Antipepton» ein Gemenge von «echtem» Pepton mit reichlichen Mengen keinen Peptoncharakter mehr tragender Endprodukte der Trypsinverdauung war.

Aber auch die Untersuchungen Pollitzer's sind nicht geeignet, volle Sicherheit zu geben. Pollitzer verfütterte Protoalbumose, Heteroalbumose, Dysalbumose und ein Gemenge von Peptonen, sämmtlich aus Fibrin gewonnen. Die Darstellung der Proto- und Hetero- bzw. Dysalbumose geschah nach Kühne's Vorschrift aus Wittepepton und aus mit Magensaft verdaulichem Fibrin in der Art, dass die beiden Albumosen gemeinsam drei Mal mit Steinsalz gefällt, darauf bis zur Entfernung des Chlors dialysirt wurden. Dadurch sollte die Trennung der Heteroalbumose, welche dabei ausfällt, von der Protoalbumose, die in Lösung bleibt, erzielt werden. Nun ist aber, wie seitdem E. P. Pick³⁾ nachgewiesen hat, auf diesem Wege bei öfterer Wiederholung der Procedur wohl die Gewinnung einer annähernd reinen Heteroalbumose, nicht aber reiner Protoalbumose möglich, da die Abscheidung der Heteroalbumose aus der protoalbumosehaltigen Lösung auch bei anhaltender Dialyse eine ganz unvollständige ist.

Man kann danach nur annehmen, dass Pollitzer's Protoalbumose ein Gemenge von beiden Albumosen war, wie dies auch schon daraus zu entnehmen ist, dass Pollitzer mehr Proto- als Heteroalbumose erhielt, während E. P. Pick (und ich selbst bei Gelegenheit der anzuführenden Versuche) bei exacterer Trennung zu dem entgegengesetzten Resultate kam. Pollitzer fand nun bei seinem nur 3 1/2 kg schweren Hunde an 2 Tagen, wo dieses Albumosengemenge neben Reisstärke

¹⁾ Pollitzer, Ueber den Nährwerth einiger Verdauungsprodukte des Eiweisses. Pflüger's Archiv, 1885, Bd. XXXVII, S. 301.

²⁾ Ellinger a. a. O.

³⁾ E. P. Pick a. a. O., Bd. XXVIII, S. 238.

und Schmalz gereicht wurde, einen ebenso grossen Stickstoffansatz wie an den vorhergehenden Tagen, wo die entsprechende Menge Fleisch neben der gleichen Zukost verfüttert worden war. Man darf vielleicht daraus den Schluss ziehen, dass dieses Albumosengemenge Fleisch zu ersetzen vermochte, dass dies aber reine Protoalbumose für sich vermag, kann daraus nicht geschlossen werden.

Nun hat Pollitzer auch einen Fütterungsversuch mit einem Gemenge von etwa 3 Theilen Heteroalbumose und einem Theil Dysalbumose angestellt und dabei sogar einen besonders grossen Ansatz erzielt. Leider reichte der Vorrath nur für einen einzigen Versuchstag, so dass Pollitzer von einer Schlussfolgerung absieht, da « die Möglichkeit nicht ganz abgewiesen werden kann, dass hier eine Tücke des Zufalles im Spiele gewesen. »¹⁾

Das von Pollitzer benützte « Pepton » war nach Kühne durch 8 tägige Verdauung von Fibrin, Neutralisation, Aussalzen des Filtrats mit Ammonsulfat, Abfiltriren und Entfernung des Ammonsalzes durch Auskrystallisiren und Ausfällung mit Barythydrat, endlich Fällen mit Alkohol dargestellt. Mit diesem Präparat, das noch erhebliche Mengen Chlorammonium enthielt, vermochte Pollitzer in einem 2 tägigen Fütterungsversuch trotz eintretenden Durchfalls annähernd denselben Stickstoffansatz zu erzielen, wie mit der äquivalenten Fleischmenge. Soweit sich jetzt beurtheilen lässt, dürfte dieses « Amphopepton » aus der nur durch Sättigung mit Ammonsulfat und Säurezusatz fällbaren « C-Albumose » Pick's, aus Peptonen, aber auch aus den nach Zunz²⁾ bei intensiver Pepsinverdauung entstehenden, nicht mehr peptonähnlichen Endprodukten, soweit sie durch Alkohol fällbar sind, bestanden haben. Jedenfalls lag ein Gemenge vor, und der Rückschluss, dass ein bestimmtes einzelnes Verdauungsprodukt den Ersatz des Fleisches bewirkt habe, ist, so beachtenswerth dieser Befund sonst erscheint,

¹⁾ Pollitzer a. a. O., S. 308.

²⁾ E. Zunz, Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVIII, S. 132.

nicht gestattet. Für die Beurtheilung der günstigen Resultate Pollitzer's kommt, wie er selbst hervorhebt, der Umstand in Betracht, dass das Fleisch eine erhebliche Menge (Pollitzer rechnet 10%) stickstoffhaltiger Stoffe enthält, denen ein Eiweisswerth nicht zukommt, dass die Zufuhr der von solchen Beimengungen freien Albumosen und Peptone somit einer entsprechend höheren Fleischzufuhr entspricht.

Wie zu ersehen, gehen Pollitzer's Resultate mit «Protoalbumose und dem Amphopepton» an Beweiskraft nicht über jene der anderen Autoren, die mit Verdauungsgemengen gearbeitet haben, hinaus.

Sie zeigen nicht, dass ein bestimmtes Verdauungsprodukt für das intacte Eiweiss eintreten kann. Nur der, freilich vom Autor selbst als nicht ganz sicher hingestellte, Versuch mit Hetero- und Dysalbumose könnte zu einem solchen Schlusse Anlass geben.

Da seit der Zeit, wo Pollitzer seine Versuche ausführte, die Methoden zur Gewinnung gut charakterisirter Verdauungsprodukte eine bedeutende Verbesserung erfahren haben, bin ich, von Herrn Professor Hofmeister veranlasst, der Frage neuerlich nähergetreten und habe Fütterungsversuche mit 3 der am besten und in ausreichend reinem Zustand zugänglichen Albumosen, der Heteroalbumose des Fibrins und zwei verschiedenen aus Casein entstehenden Protoalbumosen, vorgenommen.

II.

Versuche mit der Heteroalbumose des Fibrins.

A. Darstellung.

Das verwendete Präparat wurde nach dem von Pick angegebenen Verfahren aus 2 kg. Wittepepton in folgender Weise gewonnen:

Eine möglichst concentrirte Lösung von Wittepepton wurde mit gleichem Volumen 96%igen Alkohols versetzt, über Nacht stehen gelassen, und der reichliche Niederschlag, der die Heteroalbumose enthält, 2 Mal in 10%iger neutraler Lösung mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat gefällt. Da jedoch das Wittepepton nicht zu vernachlässigende

Mengen der zuerst von E. Zunz¹⁾ beschriebenen Albumose Aa enthält, deren untere Fällungsgrenze bei 42% Sättigung mit Ammonsulfat liegt, wurde die schon 2 Mal gefällte Heteroalbumose noch 2 Mal in 10%iger neutraler Lösung mit so viel Ammonsulfat versetzt, dass die untere Fällungsgrenze der Albumose Aa nicht erreicht wurde.²⁾

Nach der dritten Fällung zeigte es sich, dass ein Theil der Heteroalbumose unlöslich geworden, in Dysalbumose übergegangen war. Von einer weiteren Verarbeitung dieses Theiles, der noch sehr schwache Reaction nach Molisch zeigte, also noch Spuren von anderen Albumosen beigemischt enthielt, musste abgesehen werden. Da der löslich gebliebene Theil noch dasselbe Verhalten bei der Reaction nach Molisch aufwies, die wegen ihrer Empfindlichkeit ein ausgezeichnetes Kennzeichen für die Reinheit der Heteroalbumose darstellt, so wurde er noch einmal mit Ammonsulfat gefällt. Um ihn vom Ammonsulfat zu trennen, wurde er 2—3 Mal mit Alkohol behandelt. Es gelang auf diesem Wege, allerdings nicht ohne erhebliche Verluste, fast alles Salz zu entfernen, da die Heteroalbumose schon in 82%igem Alkohol unlöslich ist, einer Concentration, wobei der grösste Theil des Salzes noch in Lösung bleibt. Die gelblichbraun aussehende Fällung wurde mit Aether gewaschen und, da die Reaction mit Nessler's Reagens noch Spuren von Ammonsulfat erkennen liess, einige Tage gegen fliessendes Wasser dialysirt. So konnten die letzten Reste von Salz weggebracht werden. Die Substanz wurde darauf mehrmals mit Aether gewaschen und bei 40° getrocknet.

Gepulvert stellte die verfütterte Heteroalbumose ein braun-gelbes Pulver dar, welches reactionell genau dasselbe Verhalten zeigte, wie die Heteroalbumose Pick's. Die Reaction nach Molisch war negativ, die nach Millon gab keine Färbung der Flüssigkeit, nur eine Rothfärbung der abgeschiedenen Flocken, die Reaction auf durch Alkali abspaltbaren Schwefel war sehr schwach.

B. Fütterungsversuch.

Betreffs der Technik des Fütterungsversuches kann ich mich, da dieselbe sich in allen wesentlichen Punkten dem allgemein geübten Vorgehen anschloss, kurz fassen.

1) E. Zunz, Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte mittelst Zinksulfat. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII, S. 219.

2) Es rührt diese Albumose von Verunreinigung des Fibrins mit Hämoglobin her, unter dessen Verdauungsprodukten sie von Baer und mir in reichlicher Menge aufgefunden wurde.

Als Versuchsthier diente eine etwa 7 kg. schwere Hündin. Die Wahl eines mittelgrossen Versuchstieres — Pollitzer hatte seine Versuche an einem halb so grossen Hunde angestellt — erfolgte im Interesse der Zuverlässigkeit des Versuches.

Allerdings mussten in Folge dessen sehr grosse Mengen Nährmaterial vorbereitet werden, und so günstige Ausbeute das Wittepepton an Heteroalbumose im Vergleich zu anderen Albumosen gewährt, so war doch die Reindarstellung der genügenden Quantität eine äusserst langwierige Arbeit.

Bei den Stoffwechselversuchen wurde vom Stickstoffgleichgewicht ausgegangen. Zu diesem Zwecke wurden grössere Mengen Fleisch von sichtbarem Fett- und Bindegewebe möglichst gereinigt, durch eine Zerkleinerungsmaschine geschickt und dann in gut verschlossenen Gefässen im Eisschranke aufbewahrt. Von dem gut gemischten Fleischbrei, der sich so 3—4 Wochen hielt, wurde eine Anzahl Proben zur Bestimmung des Stickstoffs benützt. Neben diesem stickstoffhaltigen Futter wurde noch ausgelassenes und filtrirtes Schweineschmalz, dessen Stickstoffgehalt nie 0,1% erreichte, daneben eine entsprechende Menge Wasser gereicht. Kohlenhydrat wurde nicht gegeben, um die Verhältnisse der Ernährung möglichst einfach zu gestalten.

Das Futter wurde dem Thierte täglich in 2 Portionen gereicht, immer zu derselben Zeit und in denselben Mengenverhältnissen. Zur Gewinnung des Harnes wurde die Hündin 3 Mal täglich um dieselbe Zeit katheterisirt, und es konnte so der Harn quantitativ gesammelt und genau abgegrenzt werden. Der Koth wurde jedesmal mit 4 Korkstückchen 12 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme abgegrenzt; es erwies sich diese Abgrenzung als durchaus zuverlässig. Der auf dem Wasserbade unter Zusatz von etwas stickstofffreier Säure getrocknete Koth wurde zerrieben und durch Sieben von Haaren befreit. Zur Bestimmung des Stickstoffs diente überall die Methode nach Kjeldahl-Argutinsky.

In der Vorbereitungsperiode erhielt der Hund täglich 190 g Fleisch, das im Mittel von 6 Bestimmungen 3,69% Stickstoff enthielt, daneben wurden noch 70 g Fett, dessen Stickstoffgehalt 0,071% betrug, und 200 ccm. Wasser gegeben. Während der Albumosentage erhielt der Hund die gleiche Menge Fett und Wasser. Das Fleisch wurde durch eine dem Stickstoff nach entsprechende Menge Albumose ersetzt, wobei jedoch die Extractivstoffe, deren Menge nach Voit¹⁾ 7% des

1) Voit, Hermann's Handbuch der Physiologie, Bd. VI, S. 61.

Gesammtstickstoffes beträgt, in Abzug gebracht und durch die äquivalente Menge Fleischextract ersetzt wurden. Der Stickstoffgehalt des Fleischextracts betrug nach 2 Bestimmungen 9,46% und 9,49%, im Mittel 9,475%. Das Thier erhielt davon 5,1 g täglich. Am ersten Tage der Albumosenfütterung erhielt das Thier eine Portion der Heteroalbumose, die noch eine Spur Reaction nach Molisch aufwies, am zweiten Tage Morgens von derselben Portion, Nachmittags und am 3. Tag von einer keine Spur Furfurolreaction zeigenden Heteroalbumose. Der Stickstoffgehalt der ersten Albumoseportion betrug im Mittel von mehreren Bestimmungen 12,36%, der der zweiten Portion 13,137%. In der Nachperiode musste, da der vorbereitete Vorrath ausgegangen war, anderes Fleisch verfüttert werden, dessen Stickstoffgehalt, wie nachträglich bestimmt wurde, im Mittel aus 3 Bestimmungen nur 3,45% betrug.

Albumosen- tag		Hetero- albumose	Stickstoff
Am 1.	erhielt das Thier	52,81 g	mit 6,53 g
2.	„ „ „	51,31	„ 6,53
3.	„ „ „	49,85	„ 6,53

An den zwei ersten Tagen der Albumosenfütterung frass das Thier die Albumose, die mit Fett, Fleischextract und Wasser zu einem Brei angerührt war, mit grosser Gier. Am dritten Tage jedoch musste sie ihm beigebracht werden. Der Koth war genau abgegrenzt. Der Koth der beiden ersten Albumosentage war weich, aber nicht diarrhöisch. In der Befürchtung, es würden sich bei weiterer Fütterung Diarrhöen einstellen, wurde der Koth des dritten Tages abgegrenzt; in der That war derselbe diarrhöisch, und ein Zehntel des gegebenen Stickstoffes erschien im Kothe wieder. Es gelang aber nicht, im Kothe Albumosen nachzuweisen, ebensowenig zeigte der Urin etwas Abnormes.

Wie aus umstehender Tabelle hervorgeht, ist die Heteroalbumose nicht im Stande, Eiweiss ganz zu ersetzen; aus den Zahlen der beiden ersten Tage, wo Diarrhöen den Versuch nicht störten, der Koth allerdings etwas hohe Stickstoffwerthe zeigt, ist ersichtlich, dass nur 90% des Eiweisses durch sie ersetzt

Tabelle I.

Datum	Gewicht des Hundes	Harn- menge	N-Einnahme g	N-Ausgabe			N- Bilanz	Bemerkungen
				Harn	Koth	Gesamt-N- Ausgabe		
24. Nov. 1899	7065	315	Fleisch 7,01 Fett 0,05	6,733		6,87	+ 0,19	Koth um 7 Uhr Morgens abgegrenzt.
25. „ „	7080	305		6,769	0,413	6,89	+ 0,17	Abgrenzung des Kothes.
26. „ „	7060	327		6,787		6,92	+ 0,14	
27. „ „	7060	210	Albumose 6,63 Fett 0,05	7,233	0,732	7,59	- 0,53	Albumosenlage, Abgrenzung des Kothes.
28. „ „	7035	185	Fleischextr. 0,48	7,352		7,71	- 0,65	Um 9 Uhr Koth der drei Fleischlage und der zwei ersten Albumosenlage.
29. „ „	6960	190		7,095	0,65	7,74	- 0,68	
30. „ „	6970	230	Fleisch 6,81 Fett 0,05	6,69		6,83	+ 0	Abgrenzung des Kothes.
1. Dec. „	6990	309	Fleisch 6,56 Fett 0,05	7,54	0,585	7,69	- 1,08	Koth des 8. Albumosen- tages (diarrhöisch).
2. „ „	7025	280	„ „	6,68		6,83	- 0,22	Abgrenzung des Kothes.
3. „ „	7060	315	„ „	6,89		7,04	- 0,43	Koth der 4. und 5. Fleischlage.

worden sind. Im Gegensatz dazu sieht man, dass in der Nachperiode das Fleisch gut ausgenutzt wird, so dass, allerdings nicht ohne Schwankungen, deren Ursache wohl die vorhergegangene Diarrhöe war, trotz unzureichender Zufuhr die Stickstoffverluste kleiner werden.

Fassen wir die wesentlichen Resultate der Tabelle zusammen, so ergibt sich:

Tabelle II.

	Stickstoff		
	Einnahme	Ausgabe	Bilanz
Fleischfütterung (2. u. 3. Tag der Vorperiode)	14,12	13,81	+ 0,31
Albumosentage (1. u. 2. Tag)	14,12	15,30	— 1,18

Während also bei Fleischfütterung das Thier noch etwas Stickstoff ansetzt, gibt es bei Fütterung mit der äquivalenten Menge Heteroalbumose von seinem Körperbestand Stickstoff ab.

Es steht dies Resultat im Widerspruch mit dem oben erwähnten Heteroalbumoseversuch Pollitzer's, wo ein erheblicher Stickstoffansatz erzielt wurde. Da Pollitzer seinen Befund selbst als möglicher Weise durch Zufall bedingt ansieht, ist eine Discussion über diesen Punkt schwer möglich; doch möchte ich für den Fall, dass es sich bei Pollitzer doch nicht um einen Zufall handelte, auf Grund meiner Erfahrungen betonen, dass die Gewinnung von Heteroalbumose, die wirklich als von anderen Albumosen frei angesehen werden kann, nur auf langwierigem und zeitraubendem Wege zu erreichen ist. Falls Pollitzer Heteroalbumose benützt hat, wie sie sich aufs erste Mal im Dialysator ausgeschieden hatte, so muss sie noch reichlich Protoalbumose, aber auch noch secundäre Albumosen enthalten haben.

III.

Versuche mit den Protoalbumosen des Caseins.

Nachdem es sich herausgestellt hatte, dass die Heteroalbumose des Fibrins nicht im Stande ist, im Hundeorganismus Eiweiss ganz zu ersetzen, war es von erhöhtem Interesse, das

Verhalten anderer primärer Albumosen zu prüfen. Es konnte aber nicht daran gedacht werden, zu diesem Zwecke die Protoalbumose des Fibrins zu benützen, da die Ausbeute an derselben nur etwa 25 g aus 2 kg. Wittepepton beträgt. Es wurde daher als Ausgangsmaterial Casein benutzt, das nach den Untersuchungen Alexander's¹⁾ bei der Pepsinverdauung keine Heteroalbumose, sondern nur Protoalbumose liefert.

a) Darstellung der Albumosen.

Als Ausgangsmaterial diente Caseinum technicum von Merck, das kiloweise verarbeitet wurde. Als Verdauungsflüssigkeit wurde 0,4%ige Salzsäure benutzt, der 0,02% von äusserst wirksamem Pepsinum purissimum von Grübler zugesetzt war; die Flüssigkeit wurde auf eine Temperatur von 35 bis 40° gebracht und das Casein in dieselbe eingetragen, so dass die Lösung etwa 5% davon enthielt. Bei dieser für Verdauungsversuche hohen Concentration erwies sich für eine gute Ausbeute an Protoalbumose eine etwa 24stündige Verdauung als zweckmässig. Das Neutralisationspräcipitat blieb dann nahezu ganz aus. Die ihrem Aussehen nach beinahe unveränderte, trübe Flüssigkeit wurde dann mit Natronlauge neutralisirt, Anfangs so, dass die Reaction auf Congopapier neutral, auf Lackmus schwach sauer war; später erwies es sich als zweckmässig, auch auf Lackmus zu neutralisiren, da so das in erheblicher Menge vorhandene Calciumphosphat zum Theil mit entfernt werden konnte. Es wurde dann vom spärlichen Neutralisationsniederschlag abfiltrirt, das klare Filtrat in grossen Emailletöpfen auf freier Flamme auf etwa $\frac{1}{8}$ des ursprünglichen Volumens eingeeengt, nach Erkalten mit ungefähr dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols versetzt, wodurch die in Alkohol unlöslichen Albumosen ausfielen, die Protoalbumose neben anderen durch Salz schwerer fällbaren Albumosen in Lösung blieb. Von der klar filtrirten Lösung wurde darauf auf dem Wasserbade oder im Vacuum der Alkohol abdestillirt und die zurückbleibende leimartige Masse auf Protoalbumose verarbeitet.

¹⁾ F. Alexander, a. a. O.

Als die neutrale, etwa 10%ige Lösung des Rückstandes mit Ammonsulfat gefällt wurde, fiel auf, dass sich schon sehr früh bei einer Concentration von $\frac{1}{10}$ Sättigung ein dichter Niederschlag bildete; da bei Zusatz von Säure ein gleicher Niederschlag erfolgte, der allerdings bis zu einer bestimmten Concentration beim Umrühren wieder verschwand, so wurde dies Anfangs auf Anwesenheit von Fettsäuren bezogen (in dem Caseinum technicum sind solche, wie auch Milchzucker, reichlich vorhanden), zumal die Untersuchungen Alexander's ergeben hatten, dass die von ihm beschriebene Protoalbumose erst bei Viertelsättigung mit Ammonsulfat zu fallen beginnt. Bei genauerer Prüfung ergab es sich jedoch, dass dieser früh ausfallende Körper eine Albumose sui generis und gegen Salzwirkung ausserordentlich empfindlich ist. Bekanntlich wird die aussalzende Wirkung von Neutralsalzen bei Eiweisskörpern und Albumosen durch Säurezusatz sehr erheblich erhöht. Bei der vorliegenden Albumose ist nun die Empfindlichkeit gegen die Combination von Salz und Säure besonders auffällig. Um eine Trennung derselben von der von Alexander beschriebenen Protoalbumose zu erzielen, wurde die fractionirte Fällung mit Ammonsulfat benutzt. Es zeigte sich dabei, dass die untere Fällungsgrenze dieser Fraction bei einem Ammonsulfatgehalt von 0,8—1,0 ccm. (in 10 ccm. Gesamtlösung), die obere bei 2,7—2,8 ccm. in 10 ccm. Lösung liegt, dass sie also mit ihrer oberen Fällungsgrenze gerade noch an die untere Fällungsgrenze der Protoalbumose Alexander's heranreicht, deren untere Fällungsgrenze von mir in Uebereinstimmung mit Alexander bei einem Ammonsulfatgehalte von 2,6 ccm.: 10 ccm., die obere von 4,4 ccm.: 10 ccm. gefunden wurde. Es waren somit gegen Erwarten zwei Albumosen von dem Verhalten der Protoalbumose erhalten worden.

Der Kürze halber sei die durch geringere Salzconcentration fällbare Albumose Protoalbumose I, die andere, der Beschreibung Alexander's entsprechende, Protoalbumose II genannt.

Als die einzige Möglichkeit, die beiden Fractionen zu trennen, ergab sich wiederholte Fällung mit Ammonsulfat, unter Verzichtleistung auf die letzten noch fällbaren Reste der

Protoalbumose I und der ersten fällbaren Theile der Protoalbumose II.

Auf diese Weise war es leicht, die Fraction I rein darzustellen; dass es mir auch gelungen ist, die II. Albumose von der Fraction I ganz zu befreien, möchte ich nicht mit Sicherheit behaupten.

Jede Fraction wurde vier Mal in etwa 10%iger neutraler Lösung mit Ammonsulfat gefällt. Es sinkt dabei die Protoalbumose I als schmierige braune Masse auf den Boden der Gefässe, während sich die Protoalbumose II, ähnlich wie die Protoalbumose des Fibrins, in braunen Krusten an der Oberfläche der Flüssigkeit sammelt. Die Niederschläge wurden auf Thontellern von anhaftender Salzlösung befreit, neuerdings gelöst, gefällt und dieser Vorgang einige Mal wiederholt. Um die Albumosen salzfrei zu machen, wurden sie wiederholt in 45%igem Alkohol gelöst und dann so lange mit Alkohol versetzt, bis die klare Flüssigkeit sich trübte; es wurde dann klar filtrirt, die Flüssigkeit abgedampft, die zurückbleibende gelbliche Masse wieder gelöst und in der oben beschriebenen Weise wiederholt behandelt; es gelang so, die grösste Menge des Salzes ohne allzu grosse Verluste an Albumose, allerdings unter Verbrauch von sehr viel Alkohol, zu entfernen. Zur völligen Entfernung des Ammonsulfats wurden die beiden Albumosen gelöst und 48 Stunden gegen fliessendes Wasser dialysirt, darauf wieder in der oben angegebenen Weise mit Alkohol behandelt. Es gab dann Nessler's Reagens keine Spur von Reaction mehr.

Pulverisirt stellte die Protoalbumose I ein gelblichweisses, die Protoalbumose II ein mehr gelbliches Pulver dar. Bei Extraction mit Aether zeigte es sich, dass Fettsäuren nicht mehr vorhanden waren, ebenso konnte kein Calciumphosphat mehr nachgewiesen werden. Die Körper wurden dann bei 40° zur Trockne gebracht.

b) Eigenschaften dieser Protoalbumosen.

Beide Albumosen verbrennen auf dem Platinblech ohne Rückstand. Sie lösen sich kaum im kalten, leichter im kochenden Wasser. Dabei gibt Protoalbumose II eine klare, Protoalbumose I eine trübe

Lösung, die sich beim Erkalten noch zusehends trübt. Die wässerige Lösung schmeckt bitter.

Im verdünnten Alkohol, wenn der Procentgehalt unter 70 beträgt, sind beide löslich, von 95%igem werden sie gefällt.

Gesättigte Kochsalzlösung erzeugt bei beiden Albumosen einen in der Wärme bei I schwierig, bei II ziemlich gut löslichen Niederschlag, der beim Abkühlen wieder erscheint.

Essigsäurezusatz verstärkt die Salzfallung.

Zusatz von mässig verdünnter Salzsäure und Schwefelsäure fällt I, nicht aber II. Der Niederschlag von I klärt sich beim Erhitzen, kehrt beim Erkalten wieder.

Mässig verdünnte Salpetersäure erzeugt bei beiden Niederschläge, die sich bei I schwer, bei II leicht beim Erwärmen lösen, beim Erkalten wieder ausfallen.

Etwa 10%ige Natronlauge, in geringer Menge zu der trüben Lösung von I gesetzt, bringt die Trübung zum Schwinden. Mehrzusatz erzeugt Fällung, die sich auf Wasserzusatz wieder löst. II wird durch Natronlauge nicht gefällt, wohl aber scheidet sich auf Zusatz von Kali in Substanz ein bei Verdünnung löslicher Niederschlag aus.

Metaphosphorsäure erzeugt in der Lösung der Protoalbumose I, wie andere Mineralsäuren, bei einem gewissen Zusatz Fällung, die sich im Wasser und im Ueberschuss der Lösung leicht löst; bei Protoalbumose II erzeugt Metaphosphorsäure einen dicken Niederschlag, der sich im Ueberschuss der concentrirten Lösung nicht löst, beim Erhitzen verschwindet, beim Erkalten wieder ausfällt.

Eisessig ist ohne fällende Wirkung. Chlorbaryumlösung erzeugt mit beiden Albumosen einen Niederschlag, der in Salpetersäure löslich ist. Ebenso erzeugen Kupfersulfat, Bleiacetat, Ferrocyankalium und Essigsäure mit beiden Niederschläge, der Ferrocyanidniederschlag löst sich beim Erhitzen und kehrt beim Erkalten wieder.

Concentrirte Salpetersäure gibt in Lösung der Protoalbumose I dicke Fällung, in der Wärme löslich, beim Erkalten wiederkehrend, bei geringem Erwärmen Gelbfärbung, dann auf Neutralisation mit Natronlauge braunrothe Färbung. Die Protoalbumose II wird durch concentrirte Salpetersäure schon in der Kälte sehr leicht gelöst und gelb gefärbt, auf Alkalizusatz Orangefärbung.

Millon's Reagens gibt beim Erwärmen in der Lösung beider Albumosen schön tiefrothe Färbung der Flocken und der Flüssigkeit.

Bei der Kalischmelze geben beide Faecalgeruch, nach Ansäuern Geruch nach flüchtigen Fettsäuren.

Die Reaction von Molisch ist bei beiden negativ.

Kochen mit Bleiacetat und überschüssiger Natronlauge gibt bei Protoalbumose I keine, bei Protoalbumose II nur eine verschwindend geringe Graufärbung.

Phosphor ist in Protoalbumose I überhaupt nicht,¹⁾ in Protoalbumose II nur in zweifelhaften Spuren nachweisbar.

Diesen Reactionen zufolge unterscheidet sich die Protoalbumose II von I wesentlich nur durch physikalische Eigenschaften, namentlich geringere Fällbarkeit durch Salze, Säuren und Alkali. Die Reactionen, welche auf die Anwesenheit bestimmter organischer Gruppen hinweisen, fallen bei beiden gleich aus; so die Kalischmelze, die Millon'sche, die Xanthoprotein und die Molisch'sche Probe. In dieser Beziehung zeigen sie übrigens beide das gleiche Verhalten wie das Casein selbst. Nur die Abwesenheit bezw. der geringe Gehalt an Phosphor lässt sie von diesem als constitutionell verschieden erscheinen.

Es muss dahingestellt bleiben, in welcher Beziehung die Protoalbumose I zu der von E. Salkowski²⁾ jüngst beschriebenen Caseinalbumose steht, welche als erstes Verdauungsprodukt erhalten wurde, aber in wesentlichen Punkten, namentlich dem hohen Phosphorgehalt, von dem von mir beschriebenen Körper abweicht. Jedenfalls bedarf die Untersuchung dieser Albumose der Fortführung, namentlich auch in der Richtung, ob sie auch aus nach Hammarsten gereinigtem Casein erhalten wird, eine Frage, die in Angriff zu nehmen ich aus äusseren Gründen verhindert war.

B. Fütterungsversuche.

Als Versuchsthier diente dieselbe Hündin, wie beim ersten Versuch; in Bezug auf Verabreichung des Futters wurde dieselbe Anordnung getroffen; das Thier, das inzwischen an Gewicht zugenommen hatte, erhielt jetzt 210 g Fleisch, dessen Stickstoffgehalt 3,469 % betrug, 80 g Fett und 100 ccm. Wasser.

¹⁾ Die Prüfung auf Phosphor geschah mit ungefähr 0,2 g Substanz durch Schmelzen mit Sodasalpeter, Lösen der Schmelze in Wasser, Ansäuern mit Salpetersäure, Fällen mit molybdänsaurem Ammon und Versetzen mit Ammonnitrat; es erfolgte bei Protoalbumose I weder Gelbfärbung, noch konnte nach 24stündigem Stehen bei 50° der geringste Niederschlag bemerkt werden. Bei Protoalbumose II erfolgte in der Kälte Gelbfärbung, der Niederschlag war nicht wägbare.

²⁾ E. Salkowski, Kleinere Mittheilungen. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 297.

Tabelle III.

Datum	Gewicht des Hundes	Harn- menge	N-Einnahme	N-Ausgabe			N- Bilanz	Bemerkungen
				Harn	Koth	Gesamt N- Ausgabe		
12. März 1900	8210	210	7,29 an Fleisch } 0,06 „ Fett }	7,47		7,63	— 0,28	Am 11. 9 Uhr Abends, Koth abgegrenzt.
13. „ 1900	8230	185	7,35	7,35	0,49	7,51	— 0,16	
14. „ 1900	8260	195	7,35	7,10		7,26	+ 0,1	Abgrenzung des Kothes 9 Uhr Abends.
15. „ 1900	8220	145 ?	6,78 an Albumose } 0,51 „ Fleischextr. } 0,06 „ Fett }	—	verloren		—	
16. „ 1900	8215	150	7,35	6,98	0,42	7,12	+ 0,23	Albumosenstage.
17. „ 1900	8210	145	7,35	7,17		7,31	+ 0,04	Abgrenzung des Kothes 9 Uhr Abends.
18. „ 1900	8360	135	Fleisch wie oben	6,95		7,07	+ 0,28	Am 20. März Abgrenzung des Kothes 9 Uhr Abends.
19. „ 1900	8370	126	7,35	6,82	0,36	6,94	+ 0,41	Am 22. März erfolgt Ent- leerung des Kothes der ersten Tage. Am 23. der Rest des Kothes.
20. „ 1900	8480	162	7,35	6,96		7,08	+ 0,27	

1. Fütterungsversuch mit der Protoalbumose I.

Die Protoalbumose I enthielt als Mittel aus drei Bestimmungen 14,646 % Stickstoff. Der Hund bekam täglich 46,28 g Albumose und 5,37 g Fleischextract.

Während des ersten Fütterungstages mit Albumose erfolgte eine Entleerung von Harn in den Käfig, so dass die Werthe für diesen Tag nicht berücksichtigt werden. Der Koth war weicher als Fleischkoth, aber wie aus der Zeit der Entleerung hervorgeht, nicht diarrhöisch, dagegen frass das Thier die bitter schmeckende Albumose nicht freiwillig, es wurde daher dieselbe in flüssiges Fett eingetragen, mit demselben innig verrührt; das Ganze erstarrte zu einer Masse, die leicht dem Thierte beigebracht werden konnte. Wegen des geringen Wassergehaltes der Albumose erhielt das Thier ungefähr das Doppelte an Wasser, etwa 200 ccm.

Wie aus der Stickstoffbilanz zu ersehen ist, ist diese Albumose des Caseins im Stande, Eiweiss vollkommen zu ersetzen. Während in der Vorperiode der Hund eher etwas von seinem Körpereiwiss abgab, setzte er in den Albumosentagen Stickstoff an, und dieser Ansatz dauerte auch für die Nachperiode fort, wo jetzt das gleiche Futter, wie in der Vorperiode, viel besser ausgenutzt wurde.

Stellt man die Zahlen des zweiten und dritten Tages der Vorperiode und die des zweiten und dritten Tages der Albumosenfütterung tabellarisch zusammen, so ergibt sich:

Tabelle IV.

	Stickstoff- Einnahme	Stickstoff- Ausgabe	Stickstoff- Bilanz
2. und 3. Fleischtag (Vorperiode)	14,7	14,8	— 0,1
2. und 3. Albumosentag	14,7	14,48	+ 0,27

Während in der Vorperiode eine geringe Abgabe von Stickstoff stattfindet, haben wir in den Albumosentagen einen geringen Ansatz von Stickstoff.

2. Fütterungsversuch mit Protoalbumose II.

Die Bedingungen waren dieselben wie im vorigen Versuche, und es schloss sich die Fütterung dieser Albumose an

Tabelle V.

Datum	Gewicht des Hundes	Harn- menge	N-Einnahme	N-Ausgabe			N- Bilanz	Bemerkungen
				Harn	Koth	Gesamt N- Ausgabe		
19. März 1900	8360	135	Fleisch 7,29 Fett 0,06	6,95		7,07	+ 0,28	Am 18. Abends Koth abge- grenzt.
20. „ 1900	8390	120		6,82	0,36	6,94	+ 0,41	
21. „ 1900	8480	160		6,96		7,08	+ 0,27	Um 9 Uhr Abends Abgren- zung des Koths.
22. „ 1900	8490	165	Albumose 6,78 Fleischextr. 0,51 Fett 0,06	7,0		7,14	+ 0,21	Albumosentage.
23. „ 1900	8480	155		7,12	0,29	7,26	+ 0,09	Abends Abgrenzung des Koths.
24. „ 1900	8520	160	Fleisch u. Fett wie oben	6,82		6,98	+ 0,37	Entleerung des Koths der Vorperiode u. eines Theils des Albumosenkoths.
25. „ 1900	8580	180	„	6,94	0,31	7,10	+ 0,25	Am 25. Abends Abgrenzung des Koths. Am 26. Rest des Albumosen- koths und Koth der bei- den letzten Fleischtage.

die Nachperiode des vorigen Versuchs an. Leider stand mir davon nur so wenig zur Verfügung, dass die Fütterung auf zwei Tage beschränkt werden musste.

Der Stickstoffgehalt der lufttrockenen Albumose betrug im Mittel von drei Bestimmungen 14,44 %.

Das Thier erhielt täglich 46,93 g Albumose und 5,37 g Fleischextract. Das Futter musste, wie im vorigen Versuche, dem Thiere beigebracht werden.

Aus der Tabelle V geht hervor, dass der Versuch glatt verlief, auch hier stellten sich keine Diarrhöen ein.

An den entscheidenden Tagen ergibt sich:

Tabelle VI.

	Stickstoff- Einnahme	Stickstoff- Ausgabe	Stickstoff- Bilanz
2. und 3. Fleischtag (Vorperiode)	14,7	14,0	+ 0,7
1. und 2. Albumosentag	14,7	14,4	+ 0,3

V.

Wovon hängt der ungleiche Nährwerth der Albumosen ab?

Vergleichen wir die Ergebnisse der drei Fütterungsversuche, so wie sie sich in Tabelle II, IV und VI darstellen, so finden wir, dass die Heteroalbumose des Fibrins nicht im Stande ist, für das Eiweiss der Nahrung einzutreten, während die Protoalbumosen des Caseins dies vermögen.

Es erhebt sich nun die Frage, wovon diese Ungleichheit abhängt.

Obgleich die bisherigen Erfahrungen mit Albumosenfütterung und auch die soeben mitgetheilten kein hinreichendes Material zu einer ganz befriedigenden Erörterung dieser Frage bieten, so ergeben sich doch einige Gesichtspunkte, die einer näheren Beleuchtung werth sind.

Zunächst geht aus meinen, wie aus früheren Versuchen hervor, dass die Grösse des Moleküls an sich über den Nährwerth der Proteinstoffe nicht entscheidet. Es wird von

keiner Seite bestritten, dass die Albumosen ein geringeres Molekulargewicht besitzen, als die Eiweisssubstanz, von der sie abstammen. Wenn trotzdem aus ihnen durch die intermediären Vorgänge des Stoffwechsels die Eiweisskörper des Thierleibs hervorgehen, so ist damit die relative Unabhängigkeit dieses Vorgangs von der Molekulargrösse dargethan. Wie weit diese Unabhängigkeit geht, lässt sich allerdings noch nicht genau ermessen. Wenn Pollitzer Recht hat, so wäre noch das Gemenge der Trypsinpeptone, in denen man ziemlich einfache Stoffe sehen muss, eines Wiederaufbaues zu Eiweiss fähig. Sicher steht es, nach den Versuchen von Adamkiewicz und Ellinger, dass das Gemenge der ersten Spaltungsprodukte des Fibrins, obgleich diese unter sich verschieden und zum Mindesten von Anfang an in der Vierzahl vorhanden sind (Hetero-, Proto-, sogenannte »Deuteroalbumose« A und B)¹⁾, eine solche Rückbildung ermöglicht.

Im Hinblick darauf ist es wohl nicht ohne Belang, dass die Heteroalbumose für sich allein dieser Aufgabe nicht genügt. Es müssen ihr somit chemische Eigenschaften oder Elementargruppen fehlen, welche den anderen primären Spaltungsprodukten zukommen.

E. P. Pick hat constitutionelle Unterschiede der Heteroalbumose gegenüber der Protoalbumose in folgenden Punkten gefunden:

1. in dem verschiedenen Gehalt an in basischen Gruppen gebundenem Stickstoff: bei der Heteroalbumose 38,93%, bei der Protoalbumose 25,42 %;
2. in dem geringeren Gehalt der Heteroalbumose an Tyrosin und Indol liefernden Gruppen;
3. im reichlicheren Gehalt an Leucin und einer erheblichen Menge von Glycocollgruppen.

Gegenüber anderen, als primäre Produkte der Fibrinverdauung aufzufassenden Albumosen unterscheidet sich ferner die Heteroalbumose durch den Mangel der Kohlenhydratgruppe und den relativ geringen Gehalt an leicht abspaltbarem Schwefel.

¹⁾ E. P. Pick a. a. O.

Man wird naturgemäss in einem dieser Momente den Grund des ungenügenden Nährwerths der Heteroalbumose suchen müssen.

Zunächst konnte daran gedacht werden, dass die Art der Stickstoffbindung in der Heteroalbumose, wonach darin ein ausserordentlich grosser Antheil des Stickstoffs in Form von basischen Gruppen vorhanden ist, an ihrer Minderwerthigkeit Schuld trägt.

Durch den Vergleich der bisher über die Art der Stickstoffbindung im Eiweiss bekannt gewordenen Zahlen lässt sich in dieser Richtung eine klarere Vorstellung gewinnen. Um ihr eine noch festere Grundlage zu geben, habe ich in einer Anzahl von Versuchen die entsprechenden Verhältnisse auch für die Protoalbumosen des Caseins und für das verfütterte Pferdefleisch festzustellen gesucht.

Ich bin dabei dem von W. Hausmann¹⁾ ausgebildeten Verfahren gefolgt. Bemerkt sei nur, dass ich die Dauer des Kochens mit concentrirter Salzsäure zu 8—10 Stunden festhielt, und dass ich es zweckmässig fand, erst mit Kjeldahlschwefelsäure unter Zusatz von Kalium- und Kupfersulfat so lange zu erhitzen, bis die Flüssigkeit grauschwarz geworden war, dann nach Erkalten neuerlich Kjeldahlsäure hinzuzusetzen. Es wird so die Zersetzung in den phosphorwolframsäurehaltigen Lösungen sehr beschleunigt.

I. Bestimmung der Stickstoffvertheilung in den Protoalbumosen des Caseins.

A. Bestimmung des Amidstickstoffs.

Tabelle VII.

	Gewicht der Probe	N des mit MgO abdestillirten NH ₃ in g	Amid-N in %	
				Mittel
Albumose I {	1,2440	0,02837	2,281	} 2,30
	1,41105	0,03284	2,326	
Albumose II {	0,8671	0,01351	1,55	} 1,54
	0,8802	0,01356	1,54	

¹⁾ Hausmann: a. a. O.

B. Bestimmung des Diaminostickstoffs.

Tabelle VIII.

	Gewicht der Probe	Volumen der Lösung des Phosphor- wolfram- säurenieder- schlags	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theils	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Albumose I	1,41105	250	44,84	0,0060	0,0345	2,38	2,53
	1,41105	250	44,84	0,00584	0,0325	2,31	
	1,2440	250	44,84	0,00611	0,0340	2,74	
	1,2440	250	89,68	0,0121	0,0337	2,71	
Albumose II	0,8671	250	50	0,00504	0,0252	2,91	2,90
	0,8671	250	50	0,00503	0,02514	2,90	

C. Bestimmung des Monaminostickstoffs.

Tabelle IX.

	Gewicht der Probe	Volumen des Phosphor- wolfram- säure- filtrats	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theils	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Albumose I	1,41105	250	44,84	0,0256	0,14321	10,15	10,11
	1,41105	250	44,84	0,0255	0,14223	10,08	
Albumose II	0,8802	250	50	0,0184	0,0922	10,48	10,50
	0,8802	250	50	0,0187	0,0938	10,66	
	0,8671	250	50	0,0181	0,0906	10,45	
	0,8671	250	100	0,03615	0,0903	10,42	

Tabelle X enthält die Zusammenstellung der gefundenen Mittelwerthe behufs Vergleich der aus den Summanden sich ergebenden Stickstoffzahlen mit dem für den Gesamtstickstoff gefundenen oben angegebenen Werthe.

Tabelle X.

	Amid- stickstoff	Diamino- stickstoff	Mon- amino- stickstoff	Summe	Stickstoff- gehalt
Albumose I	2,30	2,53	10,11	14,94	14,65
Albumose II	1,54	2,90	10,50	14,94	14,47

II. Bestimmung der Stickstoffvertheilung in dem verfütterten Fleische.

Es wurden zur Bestimmung 2 Portionen von dem bei den 2 letzten Fütterungsversuchen benutzten Fleische verwendet, dessen Stickstoffgehalt im Mittel 3,467% betrug.

A. Bestimmung des Amidstickstoffs.

Tabelle XI.

Gewicht der Probe	g Stickstoff des mit MgO abdestillirten NH_3	Amidstickstoff in %	
			Mittel
4,9531	0,00146	0,295	} 0,257
5,0432	0,00110	0,218	

Die sonst so scharfe Werthe ergebende Bestimmung des Amidstickstoffes zeigt beim Fleisch erhebliche Differenzen der beiden Kontrollbestimmungen. Es dürfte dies dadurch bedingt sein, dass das Fleisch kein einheitlicher Körper ist und die eine Portion vielleicht mehr Fett und Bindegewebe enthielt, als die andere.

B. Bestimmung des Diaminostickstoffs.

Tabelle XII.

Gewicht der Probe	Volumen der Lösung des Phosphorwolframsäureniederschlags	Volumen des zur Bestimmung verwendeten Theils	Gefunden			
			direkt in g	in der ganzen Probe	Stickstoff in %	Mittel
4,9531	350	44,84	0,00785	0,0501	1,22	} 1,47
4,9531	350	44,84	0,00958	0,0748	1,48	
5,0432	500	89,68	0,01437	0,08015	1,59	
5,0432	500	44,84	0,00739	0,0824	1,61	

C. Bestimmung des Monaminostickstoffs.

Tabelle XIII.

Gewicht der Probe	Volumen des Phosphor- wolfram- säure- filtrats	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theils	Gefunden			
			direkt in g	in der ganzen Probe	Stickstoff in %	Mittel
4,9531	250	44,84	0,0147	0,0819	1,654	} 1,899
4,9531	250	44,84	0,0160	0,0895	1,808	
5,0432	250	44,84	0,0183	0,1023	2,040	
5,0432	250	44,84	0,0189	0,1054	2,090	

Tabelle XIV enthält die Mittelwerthe der verschiedenen Bestimmungen im Vergleich zum gefundenen Stickstoffgehalt.

Tabelle XIV.

Amid- stickstoff	Diamino- stickstoff	Monamino- stickstoff	Summe	Stickstoff- gehalt
0,257	1,47	1,899	3,626	3,467

Bei dem Fleisch fällt der hohe Werth für Diaminostickstoff auf. Es ist aber dabei zu berücksichtigen, dass ein grosser Theil der stickstoffhaltigen Extractivstoffe dabei mitbestimmt ist, da das Kreatinin, aus Kreatin durch das Kochen mit Salzsäure entstanden, die Purinbasen des Fleisches, aber auch das Neurin des Lecithins durch Phosphorwolframsäure fällbar sind. Ihr Stickstoffgehalt beträgt nach Voit¹⁾ ungefähr 70% des Gesamtstickstoffs. Um eine von diesen Zahlen nicht sehr abweichende Grösse muss somit der Diaminostickstoff des Fleisches zu hoch gefunden werden. Daneben muss auch der Gehalt des Fleisches an Leim und Bindegewebe, die ja sehr reich an Diaminostickstoff sind, in Betracht gezogen werden, so dass für die Eiweisskörper des Fleisches die Zahlen sicher andere sein werden. Für den uns hier interessirenden Vergleich

1) Voit, a. a. O. S. 22.

haben jedoch die betreffenden noch nicht ermittelten Werthe der reinen Muskeleiweisskörper keine Bedeutung.

Die folgende Tabelle enthält die Zusammenstellung der gefundenen Werthe in Procenten des Gesamtstickstoffs. Zum Vergleich sind noch die Zahlen, die Hausmann¹⁾ für Leim, Casein und Edestin und Pick²⁾ für die Heteroalbumose gefunden haben, danebengestellt.

Tabelle XV.

	Amid- stickstoff %	Diamino- stickstoff %	Monamino- stickstoff %	Stickstoff in Summe statt 100%
Casein	13,37	11,71	75,98	101,06
Protoalbumose I des Caseins	15,69	17,27	69,01	101,97
Protoalbumose II des Caseins	10,64	20,04	72,55	103,23
Pferdefleisch	7,40	42,37 ³⁾	54,74	104,51
Edestin	10,25	38,15	54,99	103,39
Heteroalbumose des Fibrins	6,45	38,93	57,40	102,78
Leim	1,61	35,83	62,56	—

Die Durchsicht dieser Tabelle ist geeignet, über die Bedeutung der Stickstoffbindung für die Eiweissernährung einigen Aufschluss zu geben.

Ich habe die einzelnen Substanzen in der Reihenfolge angeführt, wie sie sich aus ihrem experimentell festgestellten Nährwerth ergibt. In erster Reihe das Casein, seine Protoalbumosen und das Fleisch, sodann das Edestin, das nach Zadik⁴⁾ dem Casein nicht ganz gleichwerthig ist; weiter die Heteroalbumose, welche sich geeignet zeigte, die Eiweisskörper des Fleisches zu $\frac{9}{10}$ zu ersetzen, zum Schluss den Leim, dessen Nährwerth zu etwa $\frac{5}{6}$ von jenem des Eiweisses anzusetzen ist.

Nun sieht man sofort, dass der Procentgehalt des durch

1) W. Hausmann, Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 143.

2) E. P. Pick, Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 258.

3) Davon etwa 7% nicht dem Eiweiss angehöriger Stickstoff.

4) Zadik, Pflüger's Archiv, Bd. 77, S. 1.

Kochen mit Salzsäure abspaltbaren Stickstoffs in der Reihe von oben nach unten im Ganzen abnimmt.

Wenn es auch unstatthaft wäre, hieraus den Schluss zu ziehen, dass ein höherer Gehalt an solchem locker gebundenen Stickstoff die Verwendbarkeit eines Eiweisskörpers für den Stickstoffersatz erhöht, so geht doch sicher daraus hervor, dass der Nährwerth eines Eiweisskörpers durch den Gehalt an solchem Stickstoff bis zu 15% des Gesamtstickstoffs nicht beeinträchtigt wird. Dies deutet darauf hin, dass bei den intermediären Vorgängen, die dem Eiweissansatz vorangehen, eine Abspaltung des locker gebundenen Stickstoffs nicht erfolgt, wie dies schon übrigens für die in den vorbereitenden Stadien sich abspielenden Veränderungen daraus zu entnehmen ist, dass die Pepsin- und Trypsinverdauung innerhalb der ersten für die physiologische Leistung allein in Betracht kommenden Verdauungszeit eine kaum merkliche Abspaltung von Ammoniak bewirken.

Sodann ist daraus zu entnehmen, dass auch der Gehalt an Monamino- und auch an Diaminostickstoff keineswegs über den Nährwerth entscheidet. Casein und Fleisch,¹⁾ welche nahezu an den Endpunkten der Reihe stehen, sind einander im Grossen und Ganzen gleichwerthig.

Man kommt so zu dem zunächst unerwarteten Schluss dass die Art der Stickstoffbindung für die physiologische Verwerthbarkeit der einzelnen Eiweisskörper nicht ausschlaggebend ist, oder, was im Ganzen dasselbe sagt, dass es dem Organismus wenigstens innerhalb gewisser Grenzen möglich ist, bei dem Processe des Ansatzes die verschiedenen Formen der Stickstoffbindung ohne Verlust und erheblichen Arbeitsaufwand in einander überzuführen.

Gibt sonach die Stickstoffvertheilung in den Eiweisskörpern und ihren Abkömmlingen keine Aufklärung über ihr verschiedenes Verhalten im Stoffwechsel, so muss um so mehr Gewicht auf die Art und Menge der in ihnen vorgebildeten

1) Für Pferdefleisch ist in Betracht zu ziehen, dass die Werthe für den Diaminostickstoff etwa um 7% niedriger, jene für die anderen Bindungsformen des Stickstoffs aber entsprechend höher anzusetzen sind.

Kohlenstoffkerne und ihrer Verbindungen zu Albumose- und Peptoncomplexen gelegt werden. In Bezug auf letzteren Punct sind die bisher bekannt gewordenen Thatsachen so ungenügend, dass von einer Erörterung abgesehen werden muss; aber auch in Betreff der Bedeutung der einzelnen Kohlenstoffkerne für den Nährwerth des Gesamtmoleküls liegt nur spärliches Material vor, das jedoch immerhin geeignet ist, über die bei weiteren Untersuchungen einzuschlagende Richtung einiges Licht zu schaffen.

Geht man von den beiden als minderwerthig erkannten Eiweissabkömmlingen, der Heteroalbumose und dem Leim, aus, so ergibt sich bei Vergleich der in ihnen vorhandenen Kohlenstoffkerne den echten Eiweissstoffen gegenüber die Abwesenheit von Kohlenhydratgruppen, die Abwesenheit bzw. der geringe Gehalt an Tyrosin und Indol liefernden Gruppen, hingegen ein vergleichsweise reichlicher Gehalt an Glycocollgruppen. Ein Vergleich mit anderen Eiweisskörpern zeigt nun, dass Vorhandensein oder Mangel der Kohlenhydratgruppen für den Nährwerth im Sinne des Fleischersatzes nicht von Belang sein kann, denn auch aus dem Casein hat man sich vergeblich bemüht, Kohlenhydrat abzuspalten,¹⁾ und Alexander²⁾ hat die Albumosen des Caseins, was ich bestätigen kann, kohlenhydratfrei gefunden. In dieser Beziehung hat sonach das Casein nichts vor dem Leim voraus. Es bleiben dann noch die allerdings auffälligen Verschiedenheiten im Betreff des Gehalts an Tyrosin und Indol liefernden Complexen und an Glycocollgruppen.

Da das Glycocoll in anderen Eiweisskörpern nur spärlich, in manchen vielleicht gar nicht — Spiro³⁾ hat es unter den Spaltungsprodukten des Caseins vergebens gesucht — vertreten ist, so muss der Gehalt an Glycocollgruppen in der Nahrung solange als Ersatz anderer kohlenstoffreicherer Elementargruppen des Eiweisses, des Leucins, der Glutaminsäure, des Arginins

¹⁾ Krawkow, Pflüger's Archiv, Bd. 65, S. 281.

²⁾ Alexander, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 422.

³⁾ Spiro, Ueber Nachweis und Vorkommen von Glycocoll. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 186.

u. s. w., ungenügend erscheinen, so lange nicht nachgewiesen ist, dass aus Glycocoll durch Synthese die kohlenstoffreicheren Aminosäuren des Eiweissmoleküls hervorgehen können. Eine solche Annahme ist aber für den Thierkörper, wie die Sachen jetzt liegen, nicht statthaft. Danach ist die Vorstellung gerechtfertigt, dass die Glycocollgruppen der Heteroalbumose und des Leims vor dem Ansatz abgespalten werden und genau so wie verfüttertes Glycocoll nach Oxydation zur Vermehrung des ausgeschiedenen Harnstoffs dienen. Um so viel Stickstoff, als den Glycocollgruppen entspricht, dürfte ungefähr der Nährwerth des Leims und der Heteroalbumose gegen glycocollfreie Eiweisskörper zurückstehen.

Dass die Tyrosin und Indol liefernden Gruppen der Eiweisskörper für den Organismus eine besondere Bedeutung haben, da eine Neubildung von aromatischen Gruppen im Thierkörper anscheinend nicht erfolgt, ist sehr wahrscheinlich, und es ist wohl kein zufälliges Zusammentreffen, dass die zwei untersuchten gerade in dieser Richtung schlecht bedachten Stoffe, die Heteroalbumose und der Leim, dem an Tyrosin und Indol liefernden Complexen reichen Casein nachstehen. Mehrfach hat man schon die Unfähigkeit des Leims, das Körper-eiweiss vor Zerfall zu schützen, auf das Fehlen von Tyrosin in dessen Molekül bezogen. Hermann¹⁾ glaubte daher, dass Leim bei Zusatz von Tyrosin im Stande wäre, Eiweiss zu ersetzen, und erhielt bei daraufhin unternommenen Versuchen scheinbar eine Bestätigung dieser Vermuthung, indem das Körpergewicht des Versuchsthieres zunahm; doch ergaben spätere Versuche von Lehmann²⁾ ein negatives Resultat.

Wenngleich diese Befunde keinen endgültigen Schluss gestatten, so sprechen sie doch überwiegend in dem Sinne, dass für den Eiweissansatz die Anwesenheit einer gewissen Summe von Tyrosin und Indol liefernden Complexen im Eiweissmolekül unentbehrlich ist.

¹⁾ L. Hermann u. Th. Escher, Vierteljahrsschrift der naturforsch. Gesellschaft in Zürich. 1876, S. 36.

²⁾ Lehmann, Sitzungsbericht der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München. 1886.

Wenn nun aus meinen Versuchen hervorgeht, dass gewisse Albumosen (die Protoalbumosen des Caseins) sich trefflich zum Ersatz des Eiweisses eignen, andere (die Heteroalbumose des Fibrins) aber in geringerem Maass, so ist zu erwarten, dass bei Untersuchung weiter vom Eiweissmoleküle abstehender Verdauungsprodukte sich noch grössere Unterschiede herausstellen werden; denn nachweislich zerfällt bei der peptischen und tryptischen Spaltung das grosse Eiweissmolekül nicht in gleichartige und darum gleichwerthige Bruchstücke. Im Gegentheil, je weiter die Spaltung gediehen ist, um so weniger werden die einzelnen Spaltungsprodukte im Stande sein, im Thierkörper für sich allein die chemischen Aufgaben des intacten Eiweissmoleküls zu übernehmen. Wohl ist aber auch dann noch daran zu denken, dass ein Gemenge derselben dieser Aufgabe gewachsen sein kann, wenngleich wir erst von weiteren Untersuchungen Aufschluss darüber erhoffen dürfen, in welchem Umfang und auf welchem Wege sich dieser bedeutungsvolle Vorgang vollzieht.

Ueber die Ausscheidung von leicht abspaltbarem Schwefel durch den Harn.

Von

Dr. Eugen Petry (Graz).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg.

Neue Folge. Nr. 29.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Die Ausscheidung des sogenannten neutralen Schwefels im Harn ist Gegenstand einer nicht geringen Anzahl von experimentellen und klinischen Untersuchungen und Ausgangspunkt für mehrerlei Schlussfolgerungen auf physiologischem und pathologischem Gebiet gewesen. Bedenkt man aber, dass zu dem «neutralen Schwefel» chemisch und physiologisch weit auseinander stehende Stoffe ihren Beitrag leisten: Unterschweiflige Säure, Rhodanide, Abkömmlinge des Taurins, Cysteinderivate, Aethylsulfid, Methylmercaptan, die Oxyproteinsäure, die Eiweissstoffe des normalen Harns und wohl noch andere, so wird man es begreiflich finden, dass die Einordnung der gefundenen Ergebnisse unter einfache Gesichtspunkte auf kaum überwindliche Schwierigkeiten gestossen ist, und dass es erst der neuesten Zeit vorbehalten blieb — man vergleiche die Untersuchungen von H. Benedikt¹⁾ und W. Freund²⁾ —, insoweit Klarheit zu schaffen, dass die grundlegende Frage der Abhängigkeit des neutralen Schwefels von der Schwefelzufuhr der Nahrung als vorläufig in verneinendem Sinne erledigt angesehen werden kann.

Mehr Aussicht zur Erlangung positiver und physiologisch verwertbarer Befunde böte die Beschränkung solcher Untersuchungen nur auf ganz bestimmte Componenten des neutralen Schwefels. Leider entziehen sich diese, soweit sie in nennenswerthen Mengen vorhanden sind, einer genauen quantitativen Bestimmung. Wohl aber ist in neuester Zeit durch Fr. N.

1) Zeitschr. f. klin. Med. XXXVI.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 24.

Schulz¹⁾ ein gut charakterisirter Theil des neutralen Schwefels (der leicht abspaltbare Schwefel) der Untersuchung zugänglich gemacht worden, und ich habe eine solche Untersuchung, die mir von Herrn Professor Hofmeister vorgeschlagen wurde, um so bereitwilliger aufgenommen, als durch die Studien von Schulz und eigene Versuche, über die gelegentlich berichtet werden soll, nähere Aufschlüsse über die Schwefelbindung im Eiweiss gewonnen wurden, die für die Deutung einschlägiger Fragen von Bedeutung sind.²⁾)

Indem ich betreffs der angewandten Methodik auf Schulz's ausführliche Mittheilung verweise, möchte ich nur folgende hierher gehörende Momente hervorheben:

Schulz hat selbst sein Verfahren zur Bestimmung des leicht abspaltbaren Schwefels auf Harn angewendet, ich brauchte mich nur an seine Angaben zu halten. Das Kochen des Harns mit alkalischer Bleilösung unter Zusatz von Zink («Zinkmethode») liess ich stets über 11 Stunden dauern. Ich fand nach erlangter Uebung die Bestimmung nach diesem Verfahren, wenn auch zeitraubend, doch keineswegs besonders schwierig; die trotz der umständlichen Procedures gute Uebereinstimmung der Kontrollproben zeigt, dass der auf diesem Wege aus Harn erhältliche Schwefel einer ganz bestimmten Bindungsweise entspricht. Von den bisher bekannten Harnbestandtheilen, die auf Gehalt an abspaltbarem Schwefel geprüft sind, kommen hier nur die unterschweflige Säure und das Cystin, bzw. andere Cystinderivate, in Betracht. Beide geben nach Schulz's Erfahrungen genau die Hälfte ihres Schwefels in Form von Bleisulfid ab. Die verschwindend geringe Menge im Harn vorkommender Proteinstoffe ist wohl, da diese wieder nur

1) Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 16.

2) Versuche Stadthagen's (Diese Zeitschr., Bd. IX, S. 133), diesen Antheil des Neutralschwefels in ähnlicher Weise, wie dies später Schulz durchführte, zu bestimmen, scheiterten, wohl wegen der geringen Menge dieses Körpers, welche sich durch Oxydation des Sulfids zu Sulfat leicht der Bestimmung entziehen kann. Auch der von Goldmann (ibidem, Bd. XII, S. 254) und Baumann gemachte Versuch einer Bestimmung durch Benzoylirung ergab, wie die Autoren selbst angaben, nicht befriedigende Resultate.

Hunderttheile des Gewichts an Schwefel abgeben, wenigstens für normale Verhältnisse ganz ohne Bedeutung.

Da bisher Untersuchungen über das Verhalten des leicht abspaltbaren Schwefels im Harn, abgesehen von zwei von Schulz nebenher ausgeführten Bestimmungen an Menschenharn, nicht vorlagen, war die nächste zu beantwortende Frage: ist die Menge desselben von Menge und Art der eingeführten Nahrung abhängig?

Ich habe darum entsprechende Fütterungsversuche an dem dazu am besten geeigneten Versuchsthier, dem Hund, nach Art des Stoffwechselversuchs vorgenommen.

I. Einfluss der verfütterten Fleischmengen.

Im Ganzen wurden die Versuche an vier verschiedenen Hunden durchgeführt. Zur Untersuchung wurde zumeist der an zwei Tagen von gleicher Fütterung gesammelte Harn benützt. In den Tabellen sind aber die Werthe auf je 24 Stunden umgerechnet.

Zur Fütterung diente Pferdefleisch. Da über die Schwefelbindung im Pferdefleisch und in den Eiweisskörpern desselben nichts bekannt ist, habe ich eine Bestimmung des abspaltbaren Schwefels an von Fett und Bindegewebe befreitem Pferdefleisch, wie es als Nahrung diente, ausgeführt.

Ehe ich die Schulz'sche Methode auf Fleisch anwendete, wurden in einer entsprechenden Probe die bei der Zerkochung mit Kalilauge resultirenden Rückstände auf einem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet, mit Natriumsuperoxyd verascht und auf Schwefel untersucht. Es zeigte sich, dass sie schwefelfrei waren, wodurch die Anwendbarkeit der Bestimmungsmethode des abspaltbaren Schwefels nach Schulz auf Fleisch bewiesen war.

Nach dieser Methode ergab sich sodann, dass aus 3,1814 g feuchten Pferdefleischs 0,02065 g BaSO_4 zu erhalten waren, und in einer anderen Probe ergaben 4,264 g Substanz 0,0270 g BaSO_4 . Daraus berechnet sich der Gehalt an abspaltbarem Schwefel zu 0,089 resp. 0,087, im Mittel zu 0,088%. Bei der Veraschung des Fleischs nach Asboth-Dühring ergaben 0,8577 g Substanz 0,0204 g BaSO_4 , entsprechend 0,32667% Gesamtschwefel.

Der abspaltbare Schwefel des Pferdefleischs stellt sonach 27% des Gesamtschwefels dar.

Ueber das Ergebniss des Fütterungsversuchs ist kurz Nachstehendes zu berichten: Ein ca. 8 kg schwerer Hund (A) wurde zunächst durch 8 Tage mit 500 g Pferdefleisch gefüttert, an den letzten zwei Tagen der Harn des Thieres aufgefangen, vereinigt und untersucht (I). Hierauf wurden durch 6 Tage täglich nur 200 g Pferdefleisch und 70 g Fett, 50 g Zucker und 70 g Stärke verabreicht und wieder der Harn der beiden letzten Tage auf Schwefel untersucht (II).

Bei demselben Thier wurde, nachdem es inzwischen Fütterungsversuche mit diversen Eiweisskörpern durchgemacht hatte, nach Wochen nochmals die Menge des abspaltbaren Schwefels bei Fütterung mit 500 g Fleisch bestimmt (III). Ferner stellte mir Herr cand. med. Blum in liebenswürdiger Weise den Harn eines in Stickstoffgleichgewicht befindlichen, mit 190 g Fleisch und 70 g Fett gefütterten, 7 kg schweren Hundes (B) und den Harn desselben Hundes, bei Fütterung mit 700 g Fleisch, zur Verfügung (IV, V). Dann habe ich von einem ca. 16 kg schweren, mit 500 g Fleisch täglich gefütterten Hunde (C) in gleicher Weise die Schwefelausscheidung untersucht (VI). Die erhaltenen Werthe sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich, worin S die Menge des gesammten täglich ausgeschiedenen Schwefels, S_a jene des als Schwefelmetall abspaltbaren Schwefels, $\%S_a$ das Verhältniss beider, $S = 100$ gesetzt, bedeutet.

Tabelle I.

Vers.	Hund	Gewicht	Futter	S g	S_a g	$\% S_a$
I	A	ca. 8 kg	500 g Fleisch	0,8037	0,0082	1,01
II	»	» 8 »	200 g Fleisch + 120 g Kohlehydr. + 70 g Fett	0,1249	0,0037	2,93
III	»	» 8 »	500 g Fleisch	—	0,0072	—
IV	B	» 7 »	190 g Fleisch + 70 g Fett	0,3915	0,01182	3,02
V	»	» 7 »	700 g Fleisch	1,4272	0,02124	1,48
VI	C	» 16 »	500 » »	1,3154	0,0265	2,02

Wie man sieht, ist beim genügend ernährten Hund, ob er nun Fleisch allein oder neben diesem noch ausreichend Fett oder Kohlehydrate erhält, das Verhältniss des abspaltbaren Schwefels zum Gesamtschwefel ein wenig wechselndes; es schwankt von 1—3%. Da nach Erfahrungen früherer Untersucher die Menge des Neutralschwefels eine bei Weitem grössere ist (17—40%), so stellt der abspaltbare Schwefel nur einen geringen, aber ziemlich beständigen Bruchtheil desselben dar.

Da bei Hund A und B der geringste Procentsatz mit der grössten Eiweisszufuhr (Versuch I und V) zusammenfällt, so könnte man schon daraus schliessen, dass die von Benedict angegebene relative Unabhängigkeit des Neutralschwefels von der Gesamtschwefelausfuhr auch für den leicht abspaltbaren Schwefel gilt. Zu einem endgültigen Schluss in dieser Richtung reichen freilich diese Daten nicht aus.

Um den Einfluss der Fleischezufuhr besser sicherzustellen, wurde Hund C, der vorher mit gemischter Kost ernährt worden war, durch 3 Tage mit eiweissfreier Kost (bestehend aus einem Brei von Stärkekleister, Zucker und Schweineschmalz) ernährt. Am 3. Tage dieser Fütterung wurde der Harn gesammelt und untersucht. Dieser Hungerversuch ging dem Fütterungsversuch am selben Thier (VI) unmittelbar voraus.

Versuch VII. Es fanden sich in 24 Stunden

$$S = 0,2379 \text{ g}; S_a = 0,01706 \text{ g}; \% S_a = 7,17.$$

Wie ersichtlich, betrug die Gesamtmenge des Gesamtschwefels etwa $\frac{1}{8}$, die Menge des abspaltbaren Antheils aber $\frac{2}{8}$ von den entsprechenden Werthen des Fütterungstages. Der abspaltbare Schwefel wird sonach bei Eiweiss hunger vom Organismus in relativ viel grösserer Quantität abgegeben, als oxydirter, wie dies bereits für den «Neutralschwefel» bei Fütterung mit eiweissarmer Nahrung bzw. beim Hunger von Voit und Bischof,¹⁾ Heffter,²⁾ Fr. Müller³⁾ und Anderen

1) Die Gesetze der Ernährung des Fleischfressers. Leipzig 1860.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 38.

3) Berliner klin. Wochenschrift, 1887, 433.

nachgewiesen wurde. Man darf wohl annehmen, dass diese Abgabe nicht Folge der Eiweissentziehung ist, sondern dass auch bei normaler Kost ein gleiches Quantum solchen Schwefels zur Ausscheidung gelangt, erhöht um einen geringen Werth, welcher als Rest von verfüttertem, abspaltbarem Schwefel angesehen werden kann, aber auch aus anderer Quelle, nämlich von intermediär durch die Fleischzufuhr veranlassten Umsetzungen stammen könnte.

Jedenfalls ist daraus zu entnehmen, dass bei Untersuchungen über das Verhältniss des abspaltbaren Schwefels zum Gesamtschwefel ungenügende Eiweisszufuhr zu vermeiden ist, da sonst eine relative Steigerung des abspaltbaren Schwefels eintritt.

II. Ersatz von Fleisch durch andere Proteinstoffe.

A. Fütterung mit Casein.

Als Versuchsthier diente Hund A. Der Versuch schloss sich unmittelbar an den Versuch II an, und zwar so, dass durch 4 Tage statt 200 g Fleisch 70 g trockenes Caseinum technicum von Merck zur Verfütterung kamen, daneben die gleiche Menge Kohlehydrate und Fett.

Die Menge Casein war so gewählt, dass sie mindestens so viel Stickstoff enthielt, als die angeführte Fleischmenge.

Zur Beurtheilung der dabei gewonnenen Resultate war die Feststellung der Schwefelvertheilung in dem verfütterten Casein nothwendig.

1,6034 g des verfütterten Präparats ergaben, nach der Schulz-schen Methode untersucht, 0,0116 g BaSO_4 , was einem Gehalt von 0,0094 % abspaltbaren Schwefels entspricht. 1,4065 g Substanz ergaben in einer zweiten Bestimmung 0,0105 g BaSO_4 (entsprechend einem Gehalt von 0,1025 % abspaltbarem Schwefel). Das Mittel war sonach 0,101 %.

Daneben wurde in einer Probe der Gehalt dieses Präparats an Gesamtschwefel untersucht. 0,71325 g Substanz ergaben 0,0418 g BaSO_4 , woraus sich ein Gehalt von 0,805 % berechnet.

Der abspaltbare Schwefel des Caseinpräparats betrug somit 12,5% vom Gesamtschwefel.

B. An die Caseinversuche schloss sich am selben Thier

die 6 tägige Fütterung mit dem Eiweiss von Pferdeblutserum. Dasselbe war durch Coagulation von Blutserum erhalten und wurde zu 420 g täglich neben der sonst gegebenen Menge von Kohlehydraten und Fetten gereicht. Die Menge war auf Grund der Stickstoffbestimmung, welche an dem verfütterten Präparat ausgeführt wurde, so gewählt, dass dadurch etwas mehr als 200 g Fleisch dem Stickstoff nach ersetzt wurden.

Die Schwefelvertheilung in dem Eiweiss des Blutserums habe ich nicht direkt bestimmt, sie lässt sich aus vorliegenden, zuverlässigen Daten ausreichend genau berechnen. Nach Hammarsten enthält Pferde-serum 4,56 % Serumglobulin neben 2,67 % Serumalbumin. Nach Schulz enthält ersteres auf 1,38 % Gesamtschwefel 0,67 % abspaltbaren, letzteres auf 1,89 % Gesamtschwefel 0,128 % abspaltbaren. Für das Gemenge, das durch Coagulation des Serums erhalten wird, ergibt sich bei entsprechender Berechnung in 100 g Serum $S = 0,1134$ g und $S_a = 0,06291$ g. Das Verhältniss beider kann somit etwa zu 100:55,5 angenommen werden.

C. Endlich war es mir durch das Entgegenkommen von Herrn Blum¹⁾ möglich, auch den Harn des Hundes B von einem Tag, wo er ausschliesslich Heteroalbumose und Fett erhalten hatte, zu untersuchen. Nach E. P. Pick²⁾ enthält Heteroalbumose 1,22 % Schwefel, davon den grössten Theil (1,08) in abspaltbarer Form.

Die drei genannten Proteinstoffe waren deshalb gewählt worden, weil sie in Betreff ihres Gehaltes an abspaltbarem Schwefel die grössten Unterschiede aufweisen: Casein und Heteroalbumose sind beide arm an Schwefel, aber Casein enthält ihn fast nur in fest gebundener, Heteroalbumose fast nur in abspaltbarer Form. Das Gemenge von Serumalbumin und Globulin ist im Ganzen schwefelreicher, in Betreff der Menge an leicht abspaltbarem Schwefel nimmt es eine Mittelstellung ein.

Die Versuchsergebnisse sind aus nachstehender Tabelle II ersichtlich. Auch hier ist, wo der Harn von zwei Versuchstagen gemeinsam verarbeitet wurde, der pro Tag entfallende Werth angeführt.

¹⁾ S. die vorhergehende Arbeit.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 254.

Tabelle II.

Ver- such	Hund	Nahrung	S g	S _a g	% S _a	
VIII	A	70 g Casein 120 » Kohlehydrate 70 » Fett	0,2477	0,0076	3,06	} Mittel aus je zwei Tagen
IX	»	70 g Casein 120 » Kohlehydrate 70 » Fett	0,1880	0,0059	3,15	
X	»	420 g feucht. Blutalb. 120 » Kohlehydrate 70 » Fett	0,5413	0,0059	1,10	
XI	»	420 g feucht. Blutalb. 120 » Kohlehydrate 70 » Fett	0,6228	0,0138	2,22	
XII	»	420 g feucht. Blutalb. 120 » Kohlehydrate 70 » Fett	0,5873	0,0108	1,83	
XIII	B	Heteroalbumose + 70 g Fett	0,4802	0,0264	5,50	

Der Beurtheilung der aus diesen Zahlen sich ergebenden Verschiedenheiten im Verhalten der einzelnen Eiweisspräparate muss man einerseits den Gehalt dieser Eiweisskörper an Gesamtschwefel, andererseits die Schwefelvertheilung in denselben zu Grunde legen. Eine Abhängigkeit der Ausfuhr an abspaltbarem Schwefel von dem Gesamtschwefelgehalt des zersetzten Eiweisses lässt sich ohne Weiteres erkennen. Die durchschnittlichen Tageswerthe bei Serumeiweissfütterung überragen an den späteren Tagen die bei den schwefelärmeren Eiweissgemengen erhaltenen in entschiedener Weise.

In diesen Versuchen ist auch das Procentverhältniss an abspaltbarem Schwefel ein merklich geringeres, was gerade dem relativ schwefelarmen Casein gegenüber auffällt, so dass hier neuerdings die Vermuthung nahe gelegt wird, dass bei reichlicher Zufuhr von Eiweisschwefel die relative Menge des abspaltbaren Schwefels abnimmt.

Von Interesse ist auch der Vergleich der für den abspaltbaren Schwefel gefundenen Procentwerthe mit dem Gehalt

der verfütterten Eiweisskörper an abspaltbarem Schwefel (unter sonst gleichen Ernährungsverhältnissen, nämlich bei gemischter Kost).

Tabelle III.

Versuch	Sa. % des verfütterten Eiweisses	Sa. % des Harns
II, IV, VI, VII Fleisch . .	27,0 %	1,0—3,02 %
VIII, IX Casein	12,5 %	3,0—3,15 %
X, XI, XII Serumalbumin .		
+ Serumglobulin . . .	55,5 %	1,1—2,2 %
XIII Heteroalbumose . .	87,3 %	5,5 %

Sieht man von dem Albumosenversuche zunächst ab, so wird man auf Grund dieser Zahlen neuerdings zu dem Schlusse kommen, dass der Gehalt der verfütterten Eiweissstoffe an abspaltbarem Schwefel auf den Procentsatz, in dem er im Harn erscheint, nicht von Einfluss ist, dass somit die Stoffe des Harns, welche abspaltbaren Schwefel enthalten, nicht einfache Zersetzungsprodukte der Nahrung, sondern von der gerade gegebenen Ernährung unabhängige Stoffwechselprodukte sind, ein Befund, welcher mit der oben angeführten Beobachtung, dass die Ausscheidung von abspaltbarem Schwefel bei Eiweiss-hunger rasch zunimmt, in bestem Einklange steht.

Vorläufig vereinzelt ist der Befund bei der Fütterung mit Heteroalbumose. Obgleich hier (Versuch XIII) die Menge des überhaupt ausgeschiedenen Schwefels nicht erheblich grösser ist als am Vortage (Versuch IV) bei Fleischfütterung, ist die Ausscheidung an abspaltbarem Schwefel um nahe das Doppelte grösser. Man wird daher zunächst naturgemäss daran denken, dass die Heteroalbumose so gut wie ausschliesslich leicht abspaltbaren Schwefel enthält. Es darf aber nicht übersehen werden, dass sich das Versuchsthier bei Heteroalbumosen-fütterung nicht im Gleichgewicht befand, sondern einen nicht bedeutenden, aber doch merklichen Eiweissverlust erlitt.¹⁾ Bei dem Mangel an weiteren zum Vergleich heranzuziehenden

1) Vgl. die vorhergehende Arbeit des Herrn Blum.

Versuchen, namentlich über den Einfluss des Eiweisshungers, bleibt es immerhin denkbar, dass das Versuchsergebniss auf dieses Moment und nicht auf die Schwefelbindung in der Albumose zurückzuführen ist. Ueber diese Frage werden weitere Versuche entscheiden müssen.

Im Anschluss an diese Versuche muss eine Beobachtung Platz finden, welche zu den bisherigen in einem scheinbaren Widerspruch steht. Es handelt sich um Fütterungsversuche mit einem 7—8 kg schweren Hund (D), bei dem die Untersuchung der Schwefelvertheilung im Harn bei reichlicher Caseinzufuhr beabsichtigt war. In einer fünftägigen Vorperiode wurde das Thier mit einer zum grössten Theile aus eiweissarmer Nahrung, Küchenabfällen u. dergl. bestehenden «gemischten» Kost ernährt.

An zweien dieser Normaltage wurde der Harn untersucht und es fand sich

(Versuch XIV—XV)

	S	S _a	% S _a
am ersten Normaltag	0,0840 g	0,0142 g	16,95 %
» zweiten »	0,0634 »	0,01098 »	17,32 %

Das Thier erhielt sodann an einem Tage 100 g Casein und im Verlaufe der drei nächsten Tage (deren Harn gemeinsam verarbeitet wurde) 200 g Casein in wenig Milch ohne sonstigen Zusatz.

Im Harne fanden sich

(Versuch XVI—XVII)

	S	S _a	% S _a
am ersten Caseintag	0,334 g	0,0157 g	4,69 %
2.—4. Tag, Tagesmenge	0,3804 »	0,00938 »	2,46 %

Dieser Versuch zeigt sehr deutlich die geringe Abhängigkeit des abspltbaren Schwefels von der Eiweisszersetzung im Gegensatz zum Verhalten des Gesamtschwefels; darin finden die vorher beschriebenen Versuche eine Bestätigung; als auffallend an diesem Hunde muss hingegen der unvergleichlich höhere relative Gehalt des Harns an abspltbarem Schwefel bezeichnet werden, da Werthe über 70% vom Gesamtschwefel bei den übrigen Hunden nicht zur Beobachtung kamen. Dass

diese excessiv hohen Procentwerthe von 16,9—17,3 jedoch nicht in einer diesem Hunde anhaftenden Stoffwechselanomalie ihre Ursache haben, lässt sich aus dem minimalen Ausscheidungswerth an Gesamtschwefel an diesen Tagen (0,084 g, 0,063 g), ersehen, sowie aus dem Umstand, dass das Verhältniss des abspaltbaren zum Gesamtschwefel sich bei reichlicher Eiweisszufuhr derart änderte, dass es in kürzester Zeit dem bei den anderen Hunden gefundenen völlig entsprach (2,46%). Dieses Verhalten drängt zu der Annahme, dass das gemischte Futter der Vorperiode in diesem Fall Bestandtheile enthielt, welche zur Mehrausscheidung von abspaltbarem Schwefel Anlass gaben. Leider war es nachträglich nicht mehr möglich, die Art und Zusammensetzung des Futters festzustellen.

III. Der Einfluss körperfremder Stoffe.

A. Zufuhr des Schwefelkörpers der Spargelsprossen.

Die jungen Spargelsprossen enthalten, wie Hofmeister¹⁾ gefunden hat, einen wasserlöslichen schwefelhaltigen Körper, der, mit Bleiacetat und Kalilauge gekocht, intensive Schwärzung erzeugt; vermuthlich ist er ein Abkömmling der Eiweisskörper. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob die Verfütterung dieses an abspaltbarem Schwefel sehr reichen Körpers auf die Schwefelbindung im Harn von Einfluss ist.

Man musste diese Möglichkeit um so mehr ins Auge fassen, als von Nencki²⁾ das Auftreten einer schwefelhaltigen, allerdings nicht Schwefel abspaltenden Verbindung, des Methylmercaptans, nach Spargelgenuss nachgewiesen ist.

Versuch XVIII.

Es wurde 1 kg käuflicher Spargel zerkleinert, mit siedendem Wasser zerkocht, colirt und das Filtrat (welches mit Blei und Kalilauge lebhaft reagirte) dem Hund A verabreicht. Während der dreitägigen Versuchszeit erhielt das Thier täglich ausser dem Spargelextract 200 g Fleisch, Fett und Kohlehydrate.

Die Tagesmenge an abspaltbarem Harnschwefel betrug während dieser 3 Tage 0,0102 g und die an Gesamtschwefel 0,336, während

¹⁾ Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmacologie, Bd. 33, S. 205.

²⁾ Archiv f. exp. Patholog. u. Pharmacologie, Bd. 28, S. 206.

das Thier an einem Kontrolltage (Vers. II) bei gleicher Fütterung ohne Spargelextract 0,0037 abspaltbaren und 0,1249 Gesamtschwefel ausschied.

Der abspaltbare Harnschwefel ist somit nach Spargelgenuss entschieden vermehrt, aber auch der Gesamtschwefel.

Die Schwefelvertheilung im Harn erfährt dabei keine wesentliche Aenderung (3,03% gegenüber 2,93 am Kontrolltag).

B. Zufuhr von Acetonitril.

Wie S. Lang¹⁾ seinerzeit in Hofmeister's Institut gefunden hat, veranlasst die Einführung von Fettsäurenitrilen eine sehr erhebliche Steigerung der Rhodanausscheidung. Da weiter aus den Versuchen von Pascheles²⁾ hervorgeht, dass diese Rhodansynthese sich, wenigstens mit Blausäure, auch direkt beim Zusammenbringen derselben mit Eiweiss und Cystin nachahmen lässt, so war zu erwarten, dass die Zufuhr von Nitrilen eine Verminderung des im Harn auftretenden abspaltbaren Schwefels zur Folge haben dürfte.

Versuch XIX.

Es wurde dem Hunde A, während er längere Zeit hindurch 500 g Fleisch erhielt, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 4 ccm Acetonitril per os verabreicht und der Harn der beiden nächstfolgenden Tage untersucht. Derselbe enthielt 0,1874 g Gesamtschwefel und 0,0032 g abspaltbaren Schwefel $S : S_a = 100 : 1,7$.

Daraus lässt sich ersehen, dass das Verhältniss des abspaltbaren Schwefels zum Gesamtschwefel durch Nitrilfütterung nicht zu Ungunsten des abspaltbaren Schwefels beeinflusst wird (am Kontrolltag schied das Thier 1,01% des Gesamtschwefels als S_a aus), trotzdem bei der Nitrilvergiftung eine gewisse Menge des im Organismus frei werdenden abspaltbaren Schwefels diesem zur Rhodanbildung entzogen wird.

C. Im Anschluss hieran soll über einen Versuch berichtet werden, bei welchem ein im Eiweiss hunger befindliches Thier Acetonitril erhielt; diese Versuchsanordnung bezweckte, zu ermitteln, ein wie grosser Theil des Gesamtschwefels im Maximum zur Rhodanbildung herangezogen werden kann. Zu diesem Zwecke musste der Eiweissumsatz bei dem Versuchsthier durch Zufuhr grösserer Mengen stickstofffreier

1) Archiv f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 34, S. 247.

2) Ibidem, Bd. 34, S. 281.

Nahrung durch ein Minimum herabgesetzt worden, um der noch unschädlichen Mengen Nitril dennoch einen möglichst grossen Antheil vom Gesamtschwefel als Rhodan erhalten zu können.

Versuch XX.

Es wurde einem 8 kg schweren Hund, welcher durch 5 Tage hindurch nur mit Fett zubereitete Kartoffeln erhalten hatte, 2,5 ccm. Acetonitril (durch Darreichung per os) beigebracht; er erhielt an diesem und dem folgenden Tage nur Kartoffeln zur Nahrung ($\frac{1}{4}$ Pfd. pro Tag). Von der zehnten Stunde nach der Eingabe des Nitrils an wird der Harn gesammelt, um das Verhältniss der Rhodanide zur Menge des Gesamtschwefels zu ermitteln.

Der 235 ccm. messende Harn enthält 0,2201 g Gesamtschwefel und 0,13771 g Rhodanwasserstoff. Im Rhodan erscheinen somit 33,9% vom Gesamtschwefel gebunden.

Dieses Ergebniss zeigt, dass, falls auch nur wenig Eiweisschwefel zur Umsetzung gelangt, nur ein Theil desselben (hier etwa ein Drittel) zur Rhodanbildung herangezogen wird.

Die Menge des an Rhodan gebundenen Schwefels steht zur Gesamtmenge des zersetzten Eiweisschwefels in einem derartigen Verhältniss, dass die ganze als Rhodan zur Ausscheidung gelangte Menge durch den abspaltbaren Schwefel des zersetzten Eiweisses gedeckt werden kann, wenn man für letzteres einen Gehalt an solchem Schwefel in Anschlag bringt, wie ihn die Eiweisskörper des Serums und das Muskeleiweiss besitzen. Keinesfalls kann man aus diesen Zahlen Anhaltspunkte dafür gewinnen, dass bei der vitalen Rhodansynthese auch die nicht abspaltbare Schwefelgruppe des Eiweissmoleküls theilhaftig ist. Vielmehr muss man in dem verhältnissmässig niederen Rhodanwerth eine Bestätigung des von Pascheles bei der extra corpus verlaufenden Rhodansynthese gemachten Befundes für die im lebenden Organismus vor sich gehende Synthese erblicken.

D. Phosphorvergiftung.

Versuch XXI.

Mit Rücksicht auf einen Befund Goldmann's und Baumann's,¹⁾ welche an dem Harn eines mit Phosphor vergifteten Hundes eine erhebliche Vermehrung der durch Ben-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 254.

zoylirung nachweisbaren cystinähnlichen Substanz des Harns beobachteten, wurde der Hund C mit Phosphor vergiftet und nach Entwicklung des typischen Vergiftungsbildes Harn von 24 Stunden gesammelt und untersucht.

Die Darreichung des Phosphors erfolgte theils intern, theils subcutan; die ersten Vergiftungserscheinungen traten am 4. Tage auf, am 6. Tage hatte das Thier um 3200 g abgenommen. Tödtung mit Chloroform. Die Section ergab typische Phosphorleber, Lungeninfarcte, Füllung des Darms mit Blut, Ecchymosen der Blase.

Der in den letzten 24 Stunden ausgeschiedene eiweissfreie, icteriche Harn enthielt 0,0322 g an abspaltbarem und 0,87606 g an Gesamtschwefel.

Vergleicht man diese Zahlen mit den bei demselben Thier vor der Vergiftung bei reichlicher Fleischnahrung erhaltenen (Versuch VI), so zeigt sich eine vermehrte Ausscheidung an abspaltbarem Schwefel in der Phosphorperiode (0,0322 statt 0,0265 g pro Tag), und auch das Verhältniss des abspaltbaren zum Gesamtschwefel ist zu Gunsten des ersteren verschoben (von 2,02 auf 3,27%), doch sind diese Veränderungen zu gering, als dass sie nicht auch durch die geänderte Ernährungsweise (verminderte Eiweisszufuhr) bedingt sein könnten; keinesfalls gewinnt man daraus den Eindruck, als ob bei der Phosphorvergiftung ein beträchtlicher Theil des normaler Weise zu Schwefelsäure oxydirten Eiweisschwefels unzersetzt in abspaltbarer organischer Bindung den Körper durch den Harn verliesse.

E. Anhangsweise seien hier die Analysen dreier pathologischer Menschenharnen angereiht, welche beide von Krankheiten stammen, bei denen man an eine Verminderung der Oxydation denken kann.

Ein Fall von vorgeschrittener Lebercirrhose.

100 ccm. Harn enthalten 0,00467 g abspaltbaren Schwefel,
 10 „ „ „ 0,010548 g Gesamtschwefel.
 $S_a : S = 4,42 : 100.$

Ein zweiter Fall von Lebercirrhose.

650 ccm. Harn enthalten 0,01812 g abspaltbaren und
 0,47498 g Gesamtschwefel.
 $S_a : S = 3,81 : 100.$

*Ein Fall von Leukämie.*¹⁾

100 ccm. enthalten 0,0025 g abspaltbaren Schwefel und
20 ccm. 0,015 g Gesamtschwefel.

$$S_a : S = 3,27 : 100.$$

Da Schulz bei seiner Untersuchung eines normalen Menschenharnes das Verhältniss $S_a : S = 4,1 : 100$ gefunden hat, so liegt hier sicher keine Vermehrung des abspaltbaren Schwefels vor. Bei den Fällen von Lebercirrhose bildet dieser Befund eine Bestätigung der Versuchsergebnisse von Lang,²⁾ welche den geringen Einfluss der Leberexstirpation bei Gänsen auf die Ausscheidung von abspaltbarem Schwefel darthun.

IV. Beziehung des leicht abspaltbaren Schwefels zum Stoffwechsel.

Wie aus der relativ geringen Veränderlichkeit der Werthe für abspaltbaren Schwefel bei wechselnder Ernährung und aus der erheblichen Mehrausscheidung bei Eiweiss hunger hervorgeht, stellt er seiner Hauptmenge nach ein intermediäres Stoffwechselprodukt dar, dessen Bildung und Ausscheidung nur indirekt von der Nahrungszufuhr beeinflusst wird.

Da nun die verschiedenen Thierspecies einen specifischen Stoffwechsel besitzen, der auch in der Ausscheidung ihnen eigenthümlicher Produkte hervortritt, so konnte erwartet werden, dass die Werthe für abspaltbaren Schwefel im Verhältniss zum Gesamtschwefel für die einzelnen Thiere nicht die gleichen sein werden. Weiter unten gebe ich eine Uebersicht der bisher vorliegenden Bestimmungen bei gewöhnlicher Ernährung, zu denen ich Bestimmungen von Kaninchen- und Pferdeharn beigetragen habe.

Der Kaninchenharn enthielt in zwei Proben von 50 ccm. je 0,00189 g abspaltbaren Schwefel, während 10 ccm. 0,00454 g Gesamtschwefel enthielten.

Der abspaltbare Schwefel betrug somit 8,34% des Gesamtschwefels.

Der untersuchte Pferdeharn enthielt in zwei Proben von 100 ccm.

1) Der Harn musste vor beiden Schwefelbestimmungen enteiweisst werden.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 305.

je 0,00219 g abspaltbaren und in 10 ccm. 0,01786 g Gesamtschwefel. Der abspaltbare Schwefel betrug somit 1,22% vom Gesamtschwefel.

Species	Procente S _a	Beobachter	Bemerkung
Pferd	1,22	Petry	
Hund A	1,01—2,93	„	
„ C	2,02	„	
„ B	3,02	„	
Mensch	3,33	„	Leukämie
„	4,1	Schulz	Normal
„	4,3	Petry	Lebercirrhose
„	3,81	„	„
Kaninchen	8,22	„	
Gans	8—39	S. Lang	

Wenn, wie es den Anschein hat, die einzelnen Thierarten von einander durch den verschiedenen Gehalt des Harns an abspaltbarem Schwefel abweichen, so kann das auf verschiedene Zusammensetzung der Nahrung und auf spezifische Vorgänge des intermediären Stoffwechsels bezogen werden, es könnte aber auch darin seinen Grund haben, dass die Eiweissstoffe ihrer Organe in Betreff der Schwefelbindung Verschiedenheiten aufweisen. Eine Entscheidung darüber wird sich ergeben, wenn einerseits die chemische Natur der im Eiweissmolekül gegebenen schwefelhaltigen Gruppen, andererseits der im Harn auftretenden schwefelhaltigen Eiweissderivate aufgeklärt ist. Nach beiden Richtungen habe ich Untersuchungen angestellt, die mitzutheilen sich wohl bald Gelegenheit finden wird.

Ueber die ersten Spaltungsprodukte des Eiweisses bei Einwirkung von Alkali.

Von
Dr. Otto Maas (Berlin).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge. Nr. 80.)
(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Bei der Pepsinverdauung von Eiweiss entsteht neben und aus dem zuerst auftretenden Acidalbumin eine Reihe von als Albumosen und Peptone bezeichneten Produkten, welche in jüngster Zeit durch die fractionirte Fällung mit Ammonsulfat unter Beihülfe anderer Trennungsmittel der genaueren Untersuchung zugänglich geworden sind.¹⁾ Ganz ähnlich scheint sich die Spaltung des Eiweisses durch sehr verdünnte Säuren zu vollziehen. Wenigstens konnte F. Goldschmidt²⁾ auch hier durch Ammonsulfat die gleiche Anzahl von Spaltungsprodukten nachweisen.

Danach könnte es den Anschein haben, als ob sich bei jeder Art der Eiweisspaltung im Beginn die gleichen Albumosen-complexe ablösen und die Verschiedenheiten, die im weiteren Verlauf der Spaltung auftreten, auf secundäre Veränderungen zu beziehen wären.

In dieser Richtung schien die Eiweisspaltung mit Alkali von besonderem Interesse, weil erfahrungsgemäss Alkali schon in relativ niederer Concentration Eiweiss durch Ammoniak-

¹⁾ Vgl. nam. E. P. Pick, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 246 und Bd. XXVIII, S. 219.

²⁾ Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe. Dissertation. Strassburg 1898.

und Schwefelabspaltung leichter verändert als gleich vorsichtige Säurewirkung.

Von den Forschern, welche sich seit Mulder mit der Ueberführung von Eiweiss in Albuminat beschäftigt haben, ist das Auftreten von albumosen- oder peptonartigen Nebenprodukten nicht besonders berücksichtigt worden. Erst aus der letzten Zeit liegt eine etwas eingehendere Angabe vor, welche das Auftreten solcher Produkte wahrscheinlich macht. Blum und Vaubel¹⁾ erwärmten Eiweissstoffe 3—4 Stunden mit 5%iger Natronlauge auf dem Wasserbad, filtrirten von dem sich ausscheidenden, zumeist aus anorganischen Salzen bestehenden, spärlichen Niederschlag ab und fällten mit Essigsäure, wobei ein leicht in Eisessig, wenig in verdünnter Schwefelsäure, aber auch in verdünntem Alkohol namentlich in der Wärme löslicher, die Biuret- und Millon'sche Reaction darbietender Körper mit 0,1—0,0% Schwefel zur Ausscheidung kam (Theil I).

Aus dem Filtrat konnte durch Fällen mit absolutem Alkohol ein hygroskopischer, starke Biuret-, schwache Millon'sche Reaction gebender Körper mit 1—4% Schwefel niedergeschlagen werden (Theil II). Das Alkoholfiltrat gab noch Biuretreaction, aber keine Rothfärbung mit Millon's Reagens und enthielt einen stark nach Senföl riechenden schwefelreichen Körper.

Blum und Vaubel erhielten aus 100 g Eiereiweiss von den ersten beiden Fractionen je 25—30 g. Sie sind diesen Spaltungsprodukten nicht weiter nachgegangen, da ihre Untersuchung auf andere Ziele gerichtet war. Nach anderweitigen Erfahrungen muss man in Theil I vorzugsweise die Gegenwart von Albuminat, in Theil II jene von Albumosen und Peptonen vermuthen. Ob diese Produkte den bei Säure- oder Pepsinspaltung auftretenden nur ähnlich oder mit ihnen identisch sind, lässt sich nach dem Befund nicht beurtheilen.

Zur Orientirung über die einschlägigen Verhältnisse habe ich auf Anregung von Prof. Hofmeister eine Anzahl von

¹⁾ Journal f. praktische Chemie, N. F. 57, S. 365.

Versuchen angestellt, welche zur nächsten Aufgabe hatten, zu zeigen, inwieweit die Bildung von Albuminat mit Entstehung von Albumosen und Peptonen verknüpft ist, und welcher Natur die neben oder aus Albuminat entstehenden Spaltungsprodukte sind.

**I. Ueber die Bildung von Albumosen bei Alkalieinwirkung auf
Eiereiweiss und krystallisiertes Serumalbumin.**

Für den Nachweis von Albumosen und Peptonen bediente ich mich der Fractionirung mit Ammonsulfat. In Betreff der Versuchsanordnung konnte ich F. Goldschmidt folgen, welcher die Einwirkung der Säuren auf Eiweissstoffe unter wechselnden Bedingungen einer sorgfältigen und eingehenden Untersuchung unterzogen hat.

Wie Goldschmidt habe ich die Versuchsbedingungen systematisch abgeändert. Von Eiweissstoffen kamen 1. rohes Eiereiweiss, 2. krystallisiertes Serumalbumin zur Verwendung.

Das Hühnereiweiss wurde sorgfältig vom Dotter getrennt, zu Schaum geschlagen und die beim Stehen sich absetzende concentrirte Albuminlösung filtrirt. Das Serumalbumin war aus Pferdeblutserum nach Gürber und Pemsel¹⁾ dargestellt und mehrfach umkrystallisirt, zum Schluss die Lösung der Krystalle durch Dialyse von anhaftendem Ammonsulfat befreit.

Die Concentration des Alkalis wurde so gewählt, dass die zum Versuche fertige Eiweissalkalimischung eine $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{4}$, ein- und vierfache Normallösung darstellte. Als Digestions-temperatur wurden ca. 15° (Zimmertemperatur), 40° (Brutofen) und 90° (Wasserbad) festgehalten. Ueberdies wurden die Proben verschiedenen Alkaligehalts bei verschiedener Temperatur je einer 1-, 4-, 16- und 48stündigen Digestion unterworfen.

Die Ausführung der Versuche gestaltete sich so, dass im Probegläschen je 5 ccm. der Albuminlösung mit soviel titrirter Kalilauge und Wasser versetzt wurden, dass die Gesamtmflüssigkeit 10 ccm. betrug und den ins Auge gefassten Alkaligehalt aufwies. Dann folgte die Digestion bei der be-

¹⁾ Vgl. Hans Th. Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer Eiweissstoffe. Diss. Strassburg 1899, S. 20.

stimmten Temperatur, und nach Ablauf der gewählten Digestionszeit wurde die Probe zunächst neutralisirt, bis sich der entstehende Niederschlag (Albuminsäure¹⁾ und Alkalialbumose, s. u.) gut absetzte, dann filtrirt, das Filtrat zum Kochen erhitzt (Abscheidung von Resten unveränderter coagulabler Eiweisskörper), dann neuerdings filtrirt und die resultirende Flüssigkeit weiter untersucht:

1. auf Proto- und Heteroalbumose durch Zufügung von 1 Volumen kaltgesättigter Ammonsulfatlösung,

2. auf A-Albumosen durch neuerliches Hinzufügen von 1 Volumen kaltgesättigter Ammonsulfatlösung zum Filtrat von 1.,

3. auf B-Albumosen durch Sättigen des Filtrats von 2. mit gepulvertem Ammonsulfat,

4. auf C-Albumosen durch vorsichtiges Hinzufügen von mit Ammonsulfat gesättigter $\frac{1}{10}$ N-Schwefelsäure zum Filtrat von 3.,

5. auf Peptone durch Ausführung der Biuretreaction im Filtrat von 4.

Von einer Wiedergabe der zahlreichen Einzelversuche (672 ohne die zur Kontrolle nothwendigen Doppelversuche) kann ich um so eher absehen, als sich das Ergebniss verhältnissmässig einfach gestaltete.

A. Eiereiweiss.

Die Raschheit, mit der das Eiereiweiss von Alkali angegriffen wird, ist am besten daraus ersichtlich, dass nach der Digestion nur in den Proben mit $\frac{1}{16}$ Normalkali noch Reste unveränderten Eiweisses nachweisbar waren, und zwar

	nach 1	4	16	48 Std.
bei 15°	reichlich	spärlich	—	—
bei 40°	mässig	spärlich	—	—
bei 90°	spärlich,	—	—	—

¹⁾ Albuminsäure nannte schon vor Jahren Gmelin die aus Albuminat durch Säurezusatz erhältliche, die Eigenschaften einer Säure darbietende Substanz, welche zumeist auch als Albuminat bezeichnet wird. Ich möchte dem Beispiel Schmiedeberg's folgen und Gmelin's Bezeichnungswiese wieder aufnehmen.

bei den höheren Alkaliconcentrationen jedoch garnicht oder nur in unsicheren Spuren.

Die Bildung eines durch Neutralisation fällbaren Produktes (Albuminsäure, eventuell Alkalialbumose) trat in allen Proben ein, doch war seine Menge in den bei 90° gehaltenen Proben merklich geringer als bei den niederen Digestionstemperaturen. Die Gegenwart von durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Albumosen (der primären Albumosen Neumeister's) war mit Ausnahme der Versuche mit schwächster Alkalieinwirkung regelmässig festzustellen, doch handelte es sich stets um geringe, öfters verschwindend kleine Mengen.

A- und B-Albumose fehlten in der Regel, doch wurden hin und wieder minimale Trübungen erhalten, die auf ihre Anwesenheit bezogen werden konnten.

C-Albumose und Peptone konnten in keinem Fall nachgewiesen werden.

B. Krystallisirtes Serumalbumin.

Dasselbe zeigte ein recht ähnliches Verhalten.

Coagulables Eiweiss war nachweisbar in den Proben:

- mit $\frac{1}{16}$ Normalkalilösung bei 15° und 40° in allen Proben, bei 90° in den Proben von ein- und vierstündiger, nicht mehr in den von 16stündiger Digestionsdauer;
- mit $\frac{1}{4}$ Normalkalilösung bei 15° in allen Proben, bei 40° nicht mehr nach 48stündiger Digestion, bei 90° überhaupt nicht;
- mit Normalkalilösung bei 15° und 40° nur bei den je 1 und 4 Stunden digerirten Proben, nicht aber bei längerer Einwirkung und höherer Temperatur;
- mit 4fach Normalkalilösung in Spuren in einzelnen der bei 15° gehaltenen Proben, sonst überhaupt nicht.

Ein durch Neutralisation fällbarer Eiweisskörper (Albuminsäure) war in allen Proben nachweisbar; eine Abnahme seiner Menge in den Proben mit höherem Alkaligehalt und längerer Digestionsdauer war nicht erkennbar.

Die durch Halbsättigung fällbaren Albumosen waren bei 15° und 40° regelmässig vorzufinden; in den bei 90° ge-

bei höherem Alkaligehalt zumeist ganz.

A- und B-Albumosen waren nicht oder nur in Spuren nachweisbar. Albumosen C und Peptone wurden stets vermisst.

Es bietet einiges Interesse, diese Ergebnisse mit den bei Einwirkung von Säure und bei Pepsinverdauung erhaltenen zu vergleichen. Ich kann dabei an der Hand der von F. Goldschmidt gegebenen Uebersicht die einzelnen massgebenden Momente besprechen.

1. Natur der Eiweisskörper. Goldschmidt beobachtete gegenüber Säure beim krystallisierten Serumalbumin eine auffallend grössere Resistenz als beim Eialbumin, zumal bei niedrigeren Temperaturen und geringerem Säuregrad.

Aehnliches geht auch aus meinen Versuchen hervor, insofern ein Theil des Serumalbumins noch unter Bedingungen unverändert angetroffen wurde, wo Eialbumin bereits ganz in weitere Produkte umgewandelt war, wobei noch zu berücksichtigen ist, dass die angewandte Serumalbuminlösung wesentlich verdünnter war. Auch die aus dem Serumalbumin entstehenden, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Albumosen sind möglicher Weise durch grössere Widerstandsfähigkeit den entsprechenden Produkten aus Eiereiweiss gegenüber ausgezeichnet, da sie unter sonst gleichen Bedingungen in grösserer Menge angetroffen wurden. Doch lässt dieser Befund auch die Deutung zu, dass Serumalbumin durch seine Constitution zur Bildung relativ grösserer Mengen von Proto- und Heteroalbumose befähigt ist.

2. Der Alkaligehalt. Nach Goldschmidt ist die Concentration der Säure neben der Temperatur der massgebendste Factor der Säurewirkung. Ihr Einfluss äussert sich vor Allem darin, dass niedrige Concentrationen Acidalbumin, höhere das resistente Hemiprotein bilden, eventuell diese Produkte unter Spaltung weiter zersetzen. Die Einwirkung von $\frac{1}{16}$ Normalsäure bei Zimmertemperatur und 40° gestattete, die Spaltung bis zur Bildung von secundären Albumosen (A und B) zu verfolgen, die Deuteroalbumose C und Pepton wurden nur nach langer Einwirkung einer Temperatur von 95°

säure und hoher Temperatur eine Zersetzung bis über das Peptonstadium hinaus nachweisbar». — In meinen Alkaliversuchen ist der gleiche intensive Einfluss der Concentration, namentlich aus der Raschheit zu entnehmen, mit der bei höherem Alkaligehalt das native Eiweiss in Albuminat oder wenigstens in durch Neutralisation fällbare Verbindungen übergeht. In Betreff der Albumosenbildung ist ein solcher Unterschied kaum bemerkbar; die secundären Produkte der Eiweisssspaltung treten selbst bei sehr abgeschwächter Alkaliwirkung so spärlich auf, dass ein Vergleich mit höheren Concentrationen nicht gut durchführbar ist.

3. Den Einfluss der Dauer der Säurewirkung fand Goldschmidt auffällig gering. «Trotz der sehr ungleichen Grösse der Intervalle zwischen 1 und 48 Stunden zeigte sich bei Zimmertemperatur und 40° nur eine langsame Steigerung der Säurewirkung mit der Zeit der Einwirkung. Bei hohen Temperaturen, speziell bei den höheren Säureconcentrationen, ist der Einfluss merklicher.» Meine Erfahrungen mit Alkalien stimmen mit dem im ersten Satz ausgeführten Ergebniss überein. Hingegen konnte ich einen stärkeren Einfluss der Digestionsdauer bei höheren Concentrationen und Temperaturen nicht sicher wahrnehmen.

4. Wenn ferner Goldschmidt den Einfluss der Temperatur auf die Eiweisssspaltung durch Säure als einen auffallend starken bezeichnet, so kann ich betreffs der Alkaliwirkung bei Vergleich der Ergebnisse bei 15° und 40° einerseits, bei 90° andererseits das Gleiche behaupten. Zwischen den Resultaten der zwei niedrigeren Temperaturstufen ergab sich kein augenfälliger Unterschied.

5. Während in den bisher angeführten Punkten im Ganzen grosse Aehnlichkeit zwischen Alkali- und Säurewirkung hervortritt, gilt das nicht in Betreff der Art und Menge der auftretenden Produkte.

Ganz abgesehen davon, dass man allen Grund hat, das durch Alkali gebildete «Albuminat» (richtiger «Albuminsäure») für verschieden von dem aus dem gleichen nativen Eiweiss

durch Säure entstehenden Acidalbumin zu halten, macht sich ein auffallender Unterschied in Bezug auf die Bildung der Albumosen und weiteren Produkte bemerkbar.

Zunächst ist da hervorzuheben, dass, wie unten weiter ausgeführt wird, das Neutralisationspräcipitat (wenigstens beim Eiereiweiss) neben Albuminsäure eine alkohollösliche, wasserunlösliche Albumose enthält, die bei Säureeinwirkung bisher nicht beobachtet worden ist. Ferner ist das Auftreten von anderen Albumosen bei Einwirkung von Alkali überhaupt sehr eingeschränkt.

Nur die durch Halbsättigung fällbaren Albumosen treten beim Serumalbumin in mässiger, beim Eiereiweiss in spärlicher Menge auf. Die schwerer fällbaren Albumosen (A, B, C) und die Peptone waren in so geringer Menge vorhanden, dass sie sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen vielfach dem Nachweis entzogen.¹⁾

Ganz anders bei Säurewirkung und Pepsinverdauung. Goldschmidt bemerkt bei einem Vergleich der peptischen und Säurespaltung:

«Zunächst ergibt sich in Betreff der auftretenden Produkte, primären, secundären Albumosen und Peptone eine vollständige Uebereinstimmung mit der Pepsin-Säurewirkung. Doch ist ein doppelter quantitativer Unterschied ersichtlich. Die Pepsinverdauung (mit einer ca. $\frac{1}{10}$ Normalsäure) verläuft viel rascher, sie erreicht in wenigen Stunden das Ziel, die Peptonbildung, zu der reine Säurewirkung eben erst nach 16 resp. 48 Stunden bei 95° gelangt. Die Pepsinverdauung geht aber auch nicht über dieses Ziel hinaus und unterscheidet sich darin von der Einwirkung concentrirter Säuren bei höherer Temperatur, welche zum weiteren Zerfall von Albumosen und Peptonen führen.²⁾ Die

1) Da ich es in meinen Versuchen beim Peptonnachweis mit sehr verdünnten Flüssigkeiten zu thun hatte, der Nachweis mittelst Biuretreaction aber in Folge des reichlichen Alkalizusatzes eine weitere starke Verdünnung mit sich bringt, so möchte ich meinen negativen Befunden nur einen relativen Werth beimessen.

2) Diese Anschauung kann nicht mehr ganz aufrecht erhalten werden, seit E. Zunz (diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132) nachgewiesen hat, dass bei Pepsinverdauung unter bestimmten Verhältnissen reichlich Produkte entstehen, welche die Biuretreaction nicht mehr geben. Ob nicht ein Gleiches übrigens auch bei entsprechender Säurewirkung geschieht, bleibt noch zu untersuchen.

Wirkung von Pepsin + Salzsäure bei 40° unterscheidet sich von jener der reinen Salzsäure bei 40° nur durch die Raschheit des Verlaufs, nicht durch die Qualität der Endprodukte. Das Pepsin wirkt somit nur als ein beschleunigendes Agens für einen im Uebrigen von dem Ferment unabhängigen Process.

Aus der Art, wie die Albumosen auftreten, ist zu entnehmen, dass die Bildung von secundären Albumosen das Vorausgehen von primären Albumosen nicht nothwendig zur Voraussetzung hat, und dass die secundären Albumosen A und B sich unabhängig von einander bilden können. Albumose C, mit der fast stets zugleich das Pepton erscheint, stellt ein intermediäres, wenig beständiges Produkt intensiver Säurewirkung dar.

Die Thatsache, dass beim Eiereiweiss im Beginn zugleich mit Acidalbumin secundäre Albumosen, namentlich Albumose B, auftreten, spricht sehr dafür, dass die Acidalbuminbildung unter Abspaltung von Albumosencomplexen erfolgt. Die Erfahrungen am Serumalbumin in dieser Richtung sind weniger eindeutig, stehen aber im Ganzen damit im Einklang.»

Diese Verschiedenheit zwischen Säure- und Alkaliwirkung kann einmal so gedeutet werden, dass zwar durch Alkali ebensolche Albumosen entstehen, wie durch Säure, aber durch Alkali ungleich rascher weiter gespalten werden. Danach müssten die durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Albumosen gegen Alkali resistenter sein als die weiteren Abbauprodukte. Oder aber es entstehen durch Alkali andere primäre Produkte, welche nicht mehr zur Bildung der gewöhnlichen A-, B-, C-Albumose etc. führen.

Die Thatsache, dass Acidalbumin und Albuminsäure verschieden sind, dass ferner Alkali in ungleich höherem Maasse Ammoniak und Schwefel abspaltet als Säure, lassen die letztere Annahme von vornherein als die annehmbarere erscheinen. Sie wird auch durch die oben erwähnte und jetzt näher zu besprechende Auffindung einer eigenartigen, neben dem Albuminat bei stärkerer Alkalieinwirkung auftretenden Albumose gestützt.

II. Ueber die Alkalialbumose.

Die Anwesenheit dieses Produktes fiel zunächst auf, als ich das nach der Digestion mit Alkali erhaltene Neutralisationspräcipitat mit heissem Alkohol auszog. Dieser enthielt in

grösserer Menge einen die Biuretreaction gebenden, aber von den bisher beschriebenen Albumosen so verschiedenen Körper, dass es wünschenswerth schien, ihn einer genaueren Untersuchung zu unterziehen.

Um grössere Mengen dieses Zwischenprodukts zu erhalten, digerirt man je 40 g käufliches, lufttrockenes Eialbumin 3 bis 4 Stunden mit einem Liter Kalilauge, etwa von der Concentration einer Normallauge auf dem kochenden Wasserbad. Man erhält so eine dünnflüssige, gelb gefärbte Lösung, in welcher spärliche, zumeist aus anorganischen Salzen bestehende Flocken schwimmen. Man filtrirt und versetzt in der Kälte so lange mit Essigsäure, solange noch ein Niederschlag entsteht, bringt diesen aufs Filter, wäscht aus, spült ihn mit 50—60^o/oigem Alkohol in eine Kochflasche und zieht ihn wiederholt mit heissem 50—60^o/oigem Alkohol aus. Schon beim Erkalten der Auszüge scheidet sich meist ein Theil der Albumose aus; durch Verdünnen mit Wasser oder Zusatz von überschüssigem Aceton wird ein weiterer Theil zunächst als milchige Trübung gefällt, die sich mehr oder weniger rasch in Form eines gelblichen körnigen Niederschlages absetzt.

Durch wiederholtes Lösen in kochendem Alkohol von angegebener Concentration und Ausfällen mit Aceton lässt sich der Niederschlag von Verunreinigungen, namentlich auch von dem ihm hartnäckig anhaftenden feinvertheilten Schwefel befreien und wird schliesslich in Form eines blendend weissen, fein pulverigen, sich gut absetzenden Niederschlages erhalten, der makroskopisch ganz den Eindruck einer krystallinischen Abscheidung macht. Wird er aufs Filter gebracht, mit Alkohol und dann mit Aether gewaschen, so bildet er nach dem Trocknen an der Luft ein grau- oder gelblich-weisses lockeres Pulver, das im Uebrigen ganz die Eigenschaften des aus Alkohol erhaltenen Niederschlages zeigt.

Von den Eigenschaften des Körpers sei Folgendes hervorgehoben.

Er verbrennt auf dem Platinblech mit Geruch nach Horn und Leucin, unter Bildung voluminöser Kohle, ohne Hinterlassung sichtbarer Asche, löst sich nicht in kaltem, wenig in kochendem Wasser, etwas in kaltem, reichlich in kochendem verdünnten, nicht sehr in absolutem

Alkohol, kaum in Aceton, gar nicht in Aether. Bemerkenswerth ist das Verhalten der Lösung in kochendem, 50—60%igem Alkohol. Die klare Lösung trübt sich stark beim Erkalten und setzt dann an Wand und Boden einen pulverigen Niederschlag ab, der ganz das Aussehen einer krystallinischen Abscheidung (etwa dem Leucin ähnlich) besitzt und mikroskopisch aus Globuliten besteht, die aber zwischen gekreuzten Nicols keine Doppelbrechung erkennen lassen.

In schwach alkalischem Wasser geht die Substanz leicht in Lösung und lässt sich daraus durch Ansäuern fällen. Bei Verwendung von Essigsäure geht der flockige Niederschlag in einem Ueberschuss des Fällungsmittels nur schwer wieder in Lösung; Eisessig fällt diese Lösung nicht. Verdünnte Salzsäure und Salpetersäure lösen zunächst, fällen aber bei geringem Ueberschuss wieder aus. Der flockige Niederschlag löst sich in viel concentrirter Säure zum grössten Theil wieder auf. Der durch Neutralisation gefällte Niederschlag geht beim Kochen in der schwach sauren Flüssigkeit leicht in Lösung und fällt beim Erkalten als mehr oder weniger dichte Trübung wieder aus.

In kalter und kochender Kochsalzlösung löst sich weder die trockene Substanz noch der aus alkalischer Flüssigkeit frisch gefällte Niederschlag mehr als in Wasser unter gleichen Bedingungen. Die Lösung in schwachem Alkali wird durch gesättigte Kochsalzlösung nicht getrübt, wohl aber bei Eintragen von gepulvertem Kochsalz bis zur Sättigung. Concentrirte Ammonsulfatlösung erzeugt einen starken Niederschlag. Bei Zusatz eines Volumens gesättigter Lösung ist die Ausfällung eine vollständige. Nach genauerer Bestimmung beginnt die Ausfällung, wenn die Concentration der mit Ammonsulfat versetzten Lösung einer Sättigung von 18% entspricht, und ist bei 42% die Sättigung zu Ende.

Die mit möglichst wenig Salzsäure durch Verreiben der trockenen Substanz mit schwach salzsaurem Wasser hergestellte Lösung gibt mit Platinchlorid, Quecksilberchlorid, Quecksilbernitrat, Quecksilberacetat, Pikrinsäure und Bromwasser reichliche gallertige Fällung.

Die in gleicher Weise hergestellte möglichst neutrale Lösung mit Ammoniak wird nicht durch Salze der alkalischen Erden, wohl aber durch Salze der Schwermetalle gefällt.

Die alkoholische Lösung der ursprünglichen Substanz wird von manchem der genannten Fällungsmittel, z. B. von Pikrinsäure, nicht gefällt.

Die Substanz gibt stark die Biuretreaction.

Mit Millon's Reagens gibt sie beim Kochen dunkelrothe Flocken, während die Flüssigkeit ungefärbt bleibt. Salpetersäure gibt bei anhaltendem Kochen schwache Gelbfärbung, die auf Natronzusatz in schönes Gelb umschlägt. Beim Schmelzen mit Kali tritt Indol- und Skatolgeruch auf. Die erkaltete Schmelze zeigt nach Lösen und Ansäuern starken Geruch nach flüchtigen Fettsäuren.

Beim Kochen mit Bleiacetat und überschüssiger Natronlauge gibt die reine Substanz mässige Schwärzung und Bildung von Schwefelblei.

Die Rohpräparate zeigen die Reaction, vermuthlich wegen der Beimengung von Schwefel, viel intensiver.

Die Reaction nach Molisch mit α -Naphтол und die Probe von Adamkiewicz fallen positiv aus. Beim Kochen mit verdünnten Säuren gelingt es zwar, eine Lösung zu erhalten, die die Fehling'sche Flüssigkeit etwas entfärbt, ohne jedoch Kupferoxydul zur Abscheidung zu bringen. Ein Osazon ist mit Phenylhydrazin nicht zu erhalten.

Für Trypsin scheint die Substanz nicht angreifbar.

Bei Acetylirung nach Liebermann bildet sich ein anscheinend beständiges nicht krystallinisches Produkt, das sich vom ursprünglichen Körper durch Löslichkeit in Aceton unterscheidet.

Die Substanz ist stark linksdrehend. Eine vorläufige Bestimmung, welche ich Herrn Dr. v. Fürth verdanke, ergab für die specifische Drehung $(\alpha) D = -49,4^\circ$.

Für die Analyse wurde die mehrfach aus alkoholischer Lösung mit Aceton gefällte, bei 110° getrocknete Substanz benutzt.

Der Aschengehalt erwies sich in den sorgfältig gereinigten Präparaten als sehr gering. Gefunden wurde 0,094 und 0,134 %.

Die Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung wurde durch Verbrennung mit Bleichromat mit vorgelegter Kupferspirale, die Stickstoffbestimmung nach Dumas und nach Kjeldahl, die Schwefelbestimmung nach Asbóth-Düring ausgeführt.

Präparate von verschiedener Darstellung¹⁾ lieferten folgende Zahlen:

				Mittel
C	53,64 %	53,83 %	53,24 %	53,57 %
H	7,23 %	7,12 %	7,21 %	7,19 %
N	13,54 % ²⁾	13,69 % ³⁾	—	13,62 %
S	2,15 %	2,11 % ⁴⁾	—	2,13 %
O	—	—	—	23,49 %
				100,00 %

¹⁾ Die Notizen, aus denen die Zugehörigkeit der einzelnen Analysen zu bestimmten Präparaten ersichtlich wäre, sind leider verloren gegangen.

²⁾ Nach Dumas.

³⁾ Nach Kjeldahl.

⁴⁾ Dies sind die Schwefelbestimmungen, die ich als die verlässlichsten ansehe. Das Mittel der übrigen von mir an verschiedenen Präparaten erhaltenen Zahlen ist 2,05 %.

Nach Zusammensetzung und Eigenschaften unterscheidet sich, wie man sieht, die untersuchte Substanz wesentlich von anderen bisher beschriebenen Eiweissabkömmlingen. Durch ihre Unlöslichkeit in kaltem Wasser und in Salzlösungen, die Löslichkeit in Alkali und Säuren steht sie der Albuminsäure Lieberkühn's nahe. Durch die Fähigkeit, in kochenden, sehr verdünnten Säuren in Lösung zu gehen, beim Erkalten wieder auszufallen, durch den Mangel der Coagulierbarkeit gegenüber Hitze und Alkohol, bei positivem Ausfall aller sonst für Eiweissstoffe typischen Reactionen ist sie als eine Albumose im Sinne Kühne's gekennzeichnet. Ihrer Löslichkeit in Alkohol nach steht sie den von E. P. Pick als alkohollöslich charakterisirten Protoalbumosen am nächsten. Doch weicht sie von der allein bisher genauer beschriebenen Protoalbumose des Fibrins durch Reactionen und Zusammensetzung weit ab. Ich will sie daher vorläufig als Alkalialbumose bezeichnen, ohne damit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen vorgreifen zu wollen. Ueber die Beziehung der Alkalialbumose zu den einzelnen Eiweissstoffen des Hühnereiweisses habe ich keine Versuche mehr ausführen können.

Obgleich die Alkalialbumose in der Art ihrer Abscheidung mehr den Eindruck einer reinen Substanz macht, als die bisher beschriebenen Albumosen, so wäre es doch verfrüht, aus den gewonnenen Daten Schlüsse auf Formel, Molekulargewicht und Constitution zu ziehen. Nur der leichteren Uebersicht wegen sei es gestattet, zu bemerken, dass die gefundenen Analysenzahlen zu der Formel $C_{134}H_{216}N_{22}S_2O_{44}$ führen, während Lieberkühn's Albuminsäure nach der Formel $C_{77}H_{112}N_{16}SO_{22}$ und Schmiedeberg's daraus durch weitere Alkalibehandlung erhaltene Desamidoalbuminsäure¹⁾ nach der Formel $C_{160}H_{230}N_{27}S_2O_{55}$ zusammengesetzt ist.

Wie aus dem Vergleich der Formeln ersichtlich, ist die Alkalialbumose von beiden durch ihre Zusammensetzung verschieden. Dem Vergleich mit der verdoppelten Lieberkühn'schen Formel ist zu entnehmen, dass sie bei gleichem Schwefel- und Sauerstoffgehalt ärmer an Kohlenstoff, namentlich aber an Stickstoff ist, als die Albuminsäure, wie das der ammoniakabspaltenden Wirkung des Alkalis entspricht.

Der Nachweis einer durch Alkali entstehenden, von den Verdauungsprodukten weit abweichenden Albumose zeigt neuer-

1) Archiv f. experim. Path. u. Pharm., Bd. XXXIX.

dings, dass auf dem Gebiet der primären Spaltungsprodukte der Eiweissstoffe eine viel grössere Mannigfaltigkeit gegeben ist, als nach den massgebenden Erfahrungen Kühne's und seiner Schüler von vornherein erwartet werden konnte. Die grösste Schwierigkeit auf diesem Gebiet liegt in dem Mangel an Methoden zur Isolirung wirklicher chemischer Individuen. Die Alkalialbumose bietet in ihrer Alkohollöslichkeit und grossen Widerstandsfähigkeit besonders günstige Anhaltspunkte für eine weitere chemische Untersuchung, namentlich auch für die Gewinnung nahestehender krystallinischer Abkömmlinge. Eine Weiterführung der Versuche nach mehreren Richtungen ist denn auch im hiesigen Institut in Aussicht genommen.

Von Interesse schien ferner, festzustellen, ob ähnliche Albumosen auch aus anderen Eiweissarten und vielleicht auch auf anderem Wege erhalten werden können. Gelegentlich von mir ausgeführte Vorversuche haben in der That ergeben, dass der Alkalialbumose jedenfalls sehr ähnliche Produkte auch aus Fibrin und Blutalbumin zu erhalten sind. Wenigstens liess sich nach geeignetem Behandeln dieser Eiweissstoffe mit Kalilauge aus dem Neutralisationspräcipitat mit verdünntem kochenden Alkohol ein Körper ausziehen, der Biuretreaction gab und aus der alkoholischen Lösung durch Wasser- oder Acetonzusatz leicht gefällt werden konnte.

Ueber ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harn.

Von

Dr. Meinhard Pfandler aus Graz.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 31.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Dem qualitativen Nachweise der in pathologischen Harnen auftretenden Amidosäuren und deren Abkömmlinge dient eine Reihe mehr oder weniger leistungsfähiger Methoden, welche zumeist auf der Darstellung dieser Körper beruhen und nur sehr mangelhaften Einblick in die quantitativen Verhältnisse dieser Form der Stickstoffausscheidung gewähren. Nun ist aber zu erwarten, dass in Fällen, wo die Ausscheidung einzelner Amidosäuren, z. B. des Leucins und Tyrosins, nachgewiesen ist, auch andere verwandte Spaltungsprodukte der Protein-substanzen im Harn auftreten, welche, wie die Asparaginsäure und die Glutaminsäure, dem qualitativen Nachweise leicht entgehen. Da ein Verfahren, welches die Grösse der Ausscheidung von Amidosäuren oder der diesen entsprechenden Stickstoffmenge zu ermitteln gestattet, gewissen klinischen Zwecken dienlich zu sein versprach, unternahm ich auf Anregung von Professor Hofmeister den Versuch, ein solches Verfahren auszuarbeiten.

Vor allen in irgend beträchtlichen Mengen auftretenden stickstoffhaltigen und näher bekannten Harnbestandtheilen zeichnen sich die Amidosäuren — wie die eingehenden Untersuchungen von Schöndorff¹⁾ neuerdings lehren — durch ihre feste Stickstoffbindung und ihre Nichtfällbarkeit durch Phosphorwolframsäure aus. Es lag nahe, die Methode auf diese beiden Eigenschaften zu gründen.

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 62, S. 1.

Zunächst galt es also, aus dem Gesammtharne die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen und die Träger des leicht abspaltbaren Stickstoffs abzuscheiden. Letzterem Zwecke konnte die Einwirkung anorganischer Säuren bei hoher Temperatur dienen.

Es wurde im Beginne versucht, den leicht abspaltbaren Stickstoff nach dem von Hausmann¹⁾ beim Studium der Stickstoffvertheilung im Eiweissmoleküle angewandten Verfahren durch Zerkochen des Harns mit concentrirter HCl in Ammoniak überzuführen und letzteres mit Magnesia abzudestilliren. Es zeigte sich aber, dass selbst 24 stündiges Kochen des Harns mit dem mehrfachen Volumen der concentrirten Säure am Sandbade nicht genügt, um den Harnstoff völlig zu zersetzen. Von einer Salzsäurebehandlung im zugeschmolzenen Rohre — die nach Salaskin und Zaleski²⁾ zum Ziele führt — wurde abgesehen mit Rücksicht auf die angestrebte klinische Verwendbarkeit der Methode. Hingegen leistete Erhitzen mit Phosphorsäure — wie nach den Erfahrungen Schöndorffs zu erwarten stand — den verlangten Dienst.

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich die Nothwendigkeit heraus, die Phosphorwolframsäurefällung der Säurezersetzung vorangehen zu lassen, da im entgegengesetzten Falle die Körper der Harnsäuregruppe zum Theile zersetzt werden, ihre stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte der Fällung entgehen und sich dem die präformirten Amidosäuren enthaltenden Filtrate beigemengen.

Das nach mehrfacher Variation ermittelte, am besten bewährte Verfahren, welches überdies einen annähernden Ueberblick der Stickstoffvertheilung im Harne überhaupt gewinnen lässt und sich an das von Schöndorff³⁾ zwecks Harnstoffbestimmung in Blut und Organen angegebene anschließt, ist folgendes:

Der 24 stündige Harn wird über Chloroform aufgefangen, alsbald nach der Entleerung mit stickstofffreier Salzsäure angesäuert und durch Verdünnung mit ungefähr einem halben Theile Wassers auf bestimmtes Volumen gebracht. Allfällige Niederschläge werden vor Entnahme der Proben gleichmässig

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 73.

³⁾ l. c.

in der Flüssigkeit vertheilt. Damit werden nun folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. Ermittlung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl in bekannter Weise. Hierauf

2. und 3. Bestimmung des Ammoniak- und leicht abspaltbaren Stickstoffs (n_1 und f_1). 20 ccm. der Flüssigkeit werden mit etwa 40 ccm. salzsaurer Phosphorwolframsäurelösung (100 g Phosphorwolframsäure-Merck + 100 ccm. Salzsäure p. sp. 1,124 + 800 ccm. destillirtes Wasser) gefällt. Nach 24stündigem Stehen der Proben in ammoniakfreier Atmosphäre wird durch ein aschearmes (stickstofffreies) Filter in einen Erlenmeyer-Kolben klar filtrirt, der Niederschlag mit Hülfe des Filtrats quantitativ übergespült und zwei bis drei Mal mit der zur Fällung verwendeten Lösung gewaschen. Hierbei darf sich das Filtrat nicht mehr trüben. Filter mit Niederschlag wird hierauf gleichfalls in einen Erlenmeyer-Kolben gebracht und gleich dem Filtrate mit etwa 10 g krystallisirter Phosphorsäure (oder dem gleichen Gewichte der leichter erhältlichen Metaphosphorsäure)¹⁾ versetzt. Beide Kolben kommen für 18—20 Stunden in einen auf 150° C. eingestellten Trockenkasten. Nach spontaner Abkühlung der beiden Proben werden dieselben mit heissem Wasser in einen Rundkolben aus Hartglas von etwa 1 l. Capacität gespült, mit stickstofffreier Natronlauge zunächst vorsichtig annähernd neutralisirt, hierauf mit einem grossen Ueberschusse von geglühter Magnesia bis zur deutlich alkalischen Reaction versetzt und in eine mit entsprechender Menge $n/10$ -Säure beschickte Vorlage abdestillirt. Wenn der Trockenkasten geräumig genug ist, dann kann die Zersetzung mit Phosphorsäure natürlich zweckmässig bereits im Destillationskolben erfolgen. Das spontan meist sehr heftige Stossen der Flüssigkeit bei der Destillation kann durch Eintragen pulverisirten, geglühten Bims-

1) Beide Präparate, sowie die Phosphorwolframsäure sind auf Stickstoffgehalt zu prüfen. Von einer Entfernung der Phosphorwolframsäure durch CaO vor der Zersetzung (Schöndorff) wurde Abstand genommen, da bei der hierzu erforderlichen Herstellung alkalischer Reaction Ammoniakverluste zu befürchten waren.

steins oder in den Fällen, in welchen der Rückstand hinterher zu zersetzen ist, durch Luftdurchleitung (Ammoniakfilter!) vermindert werden. Nach beendeter erster Destillation und erfolgter Abkühlung des Kolbens wird dieser nochmals mit Wasser aufgefüllt und der Inhalt in eine zweite kleine Säurevorlage abdestillirt, wobei in der Regel noch einige Zehntelcubikcentimeter n_{10} -Säure neutralisirt werden.

4. und 5. Bestimmung des durch Säure nicht abspaltbaren Stickstoffs (f_2 und n_2).

Nach beendeter zweiter Destillation wird der Kolbenrückstand behufs Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl zersetzt.

Die Anwesenheit von viel Phosphorwolfram- und Phosphorsäure erschwert die Zersetzung und gibt durch Bildung von harten Beschlägen an der Kolbenwand zum Springen der Kolben Anlass. Man wird diesen Schwierigkeiten am besten dadurch begegnen, dass man grosse Mengen von Zersetzungssäure anwendet und die Kolben während der Zersetzung häufig dreht. Meist bedarf es einer ständigen Ueberwachung. Eventuell lässt sich diese Bestimmung auch ganz umgehen, indem man den Differenzwerth zwischen dem in anderen Proben bestimmten Gesamtstickstoffgehalt des Phosphorwolframsäurefiltrats bzw. -Niederschlags und dem Gehalte des aus Filtrat bzw. Niederschlag durch die Phosphorsäure- und Magnesiabehandlung abspaltbaren Stickstoffs berechnet: «indirekte Bestimmung».

Die zwei bei den Magnesiadestillationen ($n_1 + f_1$) und die bei den Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ($n_2 + f_2$) gewonnenen Stickstoffwerthe müssen sich zum Gesamtstickstoffwerthe ergänzen. Die Abweichungen betragen in gelungenen Versuchen thatsächlich höchstens 1–2%.

Der Gesamtstickstoff des — wie zunächst angenommen werden soll — eiweiss- und albumosefreien Harns wird auf diese Weise in vier Fractionen bestimmt:

1. «Fraction n_1 »; durch Phosphorsäure abspaltbarer Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen. Hierher gehört, so viel bekannt, der gesammte Stickstoff des Ammoniaks, der Carbaminsäure, des Rhodans und ein Theil des Stickstoffs der Harnsäure, der Purinbasen, des Kreatinins, des Harnmucoides, der Eiweisskörper, bzw. des Nucleoalbumins, des normalen Harns.

Ueber die Fällbarkeit des Harnammoniaks durch Phosphorwolfram-

säure liegen widersprechende Angaben vor. Während Bohland¹⁾ eine Harnstoffbestimmungsmethode darauf gründet, dass sich das gesammte Ammoniak im Filtrate vom Phosphorwolframsäureniederschlage findet, wies Gumlich²⁾ nach, dass — wenigstens unter bestimmten Bedingungen — das Ammoniak des Harns quantitativ durch Phosphorwolframsäure gefällt wird. (Reine Ammoniaklösungen verhalten sich nach Gumlich anders.) Auch Salaskin und Zaleski³⁾ fanden jüngst gelegentlich einer Harnstoffbestimmung nach Schöndorff etwa 39% des Ammoniaks im Phosphorwolframsäurefiltrate. Die Ungleichmässigkeit dieser Befunde dürfte auf der verschiedenen Qualität der Phosphorwolframsäurepräparate beruhen. Vergleichende Versuche mit der von Schöndorff angewandten Kahlbaum'schen Phosphorwolframsäurelösung und einer aus krystallinischem Merck'schen Präparate hergestellten sauren Lösung ergaben, dass letztere das Ammoniak (sowie den Rhodanwasserstoff) aus dem Harn unter den von Gumlich angegebenen Cautelen quantitativ, hingegen wässrige Harnstofflösungen von einem Gehalte unter 2—2 1/4% binnen 24 Stunden nicht fällt,⁴⁾ wogegen erstere das Ammoniak des Harns gar nicht oder nur theilweise fällt und — beiläufig bemerkt — auch Diamidosäuren und manche Peptone ins Filtrat übergehen lässt. Die Kontrolle der Ammoniakfällung wurde durch Prüfung des Filtrates auf Ammoniak nach Schlösing ausgeführt — ein Verfahren, das nach Gumlich auch bei Anwesenheit von überschüssiger Phosphorwolframsäure richtige Werthe ergibt.

2. «Fraction n_3 »; durch Phosphorsäure nicht abspaltbarer Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Körper. Es ist dies der Stickstoffrest jener bereits oben angeführten Substanzen, welche, wie Harnsäure, nur einen Theil des Stickstoffes fest gebunden enthalten, ferner der Stickstoff der Diamine, der Diamidosäuren und wohl auch der etwa vorkommenden Ptomaine. Die Summe $n_1 + n_3$ stellt den gesammten, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff dar.

3. «Fraction f_1 »; leicht abspaltbarer Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körper, d. h. der gesammte Stickstoff des Harnstoffs, des Allantoins, der Oxalursäure, eventuell ein Theil des Kreatinstickstoffes.

1) Pflüger's Archiv, Bd. XLIII, S. 31.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 13.

3) l. c., S. 84.

4) Zur Verhütung der Harnstofffällung in unserem Falle genügt daher die angegebene Verdünnung des Harns vor dem Zusatz der Phosphorwolframsäure.

Da nach den Angaben Cloëtta's¹⁾ die Oxyproteinsäure mit verdünnter Schwefelsäure zerkocht in Ameisensäure, Kohlensäure und Ammoniak zerfällt, musste daran gedacht werden, dass ihr Stickstoff wenigstens zum Theile auch durch Erhitzen mit Phosphorsäure abgespalten werden und in diese Fraction fallen könne. Ich hatte Gelegenheit, hierüber besondere Versuche anzustellen. Wässrige Lösungen von reinem oxyprotein-saurem Baryum²⁾ geben bei der beschriebenen Behandlung mit Phosphorsäure und Magnesia 54,7—58,5% ihres Stickstoffgehaltes in Form von Ammoniak ab. Mithin erscheint etwas mehr als die Hälfte des Oxyproteinsäurestickstoffs in der «Harnstoff-fraction» — unter der sehr wahrscheinlichen Voraussetzung, dass sich die Oxyproteinsäure des Harnes bezüglich der Stickstoffabspaltbarkeit nicht anders verhält, als ihr rein dargestelltes Salz.

4. «Fraction f_2 »; fest gebundener Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körper, vor allem der Amidosäuren und ihrer Derivate, wovon für den normalen menschlichen Harn das Glycocol (die Hippursäure), Taurin- und Cystinabkömmlinge, für den pathologischen Harn namentlich Leucin und seine Homologen, Tyrosin und Cystin in Betracht kommen. Die Oxyproteinsäure stellt nach Obigem zu dieser Fraction einen Beitrag von etwa 41,5—45,3% ihres Stickstoffes.

In eiweiss- und albumosehaltigen Harnen müsste die erste Fraction (n_1) durch den Amidstickstoff der Protein-substanzen, die zweite (n_2) durch deren «Mono- und Diamido-stickstoff» (Hausmann) vermehrt werden.

Wie ersichtlich, wird durch das angegebene Verfahren in Fraction f_1 gleichzeitig der Harnstoff sehr annähernd quantitativ bestimmt, da der Stickstoff dieser Fraction fast seiner ganzen Menge nach vom Harnstoff abstammt.

Ich lasse nun die Ergebnisse der an drei normalen Harnen durchgeführten Bestimmungen der Stickstoffvertheilung folgen.

1) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakol., Bd. 40, S. 29.

2) Ich verdanke das Präparat der Güte des Herrn Docenten Dr. Fritz Pregl in Graz.

Tabelle I.

Gesamtstickstoff	Direkte Bestimmungen				Indirekte und Kontrollbestimmungen			NH ₃ nach Schösing
	N des P.W.-S-Niederschlags		N des P.W.-S-Filtrats		n ₁ + n ₂ Gesamt-N des Niederschlags	f ₁ + f ₂ Gesamt-N des Filtrats	n ₁ + f ₁ ¹⁾ Gesamt-N leicht abspaltbarer N	
	n ₁ leicht abspaltbar	n ₂ schwer abspaltbar	f ₁ leicht abspaltbar	f ₂ schwer abspaltbar				
	in 20 ccm. Harn							
Milligramme Stickstoff und Procente vom Gesamtstickstoff								
1. Harn eines gesunden Mannes; gemischte Kost.								
5 ccm. Harn	13,832		130,018					
41,846	15,372	11,214	132,354	8,246				
41,604	13,510	11,494	130,369	7,266				
			129,570	8,302				
Mittel:	Mittel:	Mittel:	Mittel:	Mittel:				
41,727	14,288	11,354	130,578	7,938	22,828		146,916	
20 ccm. Harn	= 8,53%	= 6,81%	= 78,24%	= 4,76%	= 14,28%		= 88,02%	
166,908	164,108 = 98,34%							

1) Bestimmt durch Destillation des mit Phosphorsäure zersetzten Gesamtharns mit Magnesia.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Direkte Bestimmungen						Indirekte und Kontrollbestimmungen		NH ₃ nach Schlössing
Gesamtstickstoff	N_1	N_2	f_1	f_2	$n_1 + n_2$	$f_1 + f_2$	$n_1 + f_1$	
	leicht abgärbare	schwer abgärbare	leicht abgärbare	schwer abgärbare	Gesamt-J des Niederschlags	Gesamt-J des Niederschlags	Gesamt-J, leicht abgärbare I	
	I des P-W-G-Filtrates				II des P-W-G-Filtrates			
in 20 ccm. Harn								
Milligramme Stickstoff und Procente vom Gesamtstickstoff								
2. Harn des normalen Hundes I; Fleischkost.								
5 ccm. Harn								
65,692					34,244	225,680	245,680	
65,744					34,468	224,896	245,294	
Mittel:								
65,698	19,796	13,160	219,450	5,824	Mittel: 34,356	Mittel: 225,280	Mittel: 245,357	11,354
20 ccm. Harn	= 7,54%	= 5,01%	= 83,52%	= 2,22%	= 13,08%	= 85,75%	= 93,38%	= 4,33%
262,752	258,230 = 98,29%							

1) Bestimmt durch Destillation des mit Phosphorsäure zersetzten Gesamtharnes mit Magnesia.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Direkte Bestimmungen					Indirekte und Kontrollbestimmungen			NH ₃ nach Schließung
Gesamt- stickstoff	n ₁		n ₂	f ₁		f ₂	n ₁ + f ₁) Gesamt, leicht abspaltbar I	
	leicht abspaltbar	schwer abspaltbar	schwer abspaltbar	leicht abspaltbar	schwer abspaltbar	n ₁ + f ₂ Gesamt-I des Filtrats		n ₂ + f ₂ Gesamt-II des Hinderablags
in 20 ccm. Harn								
Milligramme Stickstoff und Procente vom Gesamtstickstoff								
3. Harn des normalen Hundes II; Fleischkost.								
10 ccm. Harn	21,084	Indirekt bestimmt		265,776	Indirekt bestimmt		28,266 28,714	278,644 281,148
155,540	22,064			267,314				
154,728								
Mittel:	21,574	6,913		Mittel:	266,545		Mittel:	279,896
155,134	= 6,96%	2,23%		= 85,91%	13,351		= 9,21%	= 90,21%
20 ccm. Harn	308,386		= 99,40%		4,30%			
310,268								12,502 = 4,03%

1) Bestimmt durch Destillation des mit Phosphorsäure zersetzten Gesamtharnes mit Magnesia.

Der durch die Anordnung der Bestimmungen, wie ersichtlich, mehrfach kontrollirte Befund einer nicht unbeträchtlichen Stickstoffmenge in der vierten Fraction f_4 des normalen Harns war ein unerwarteter. Auf welchen normalen Harnbestandtheil kann dieser Stickstoff bezogen werden? Der Stickstoff der Hippursäure kann im normalen Harne des Fleischfressers nach den bisher vorliegenden Angaben etwa 0,05 bis höchstens 0,5% des Gesamtstickstoffs betragen, jener der im normalen Harne noch zweifelhaft vorhandenen Spuren anderer Amidosäuren, der Taurin- und Cystinabkömmlinge kaum in Betracht kommen. Dass es sich um Reste unzersetzten Harnstoffes handle, ist angesichts der Gleichmässigkeit der für die Harnstoff-Fraction in den Kontrollversuchen gewonnenen Zahlen ausgeschlossen. Nach Bondzynski und Gottlieb¹⁾ scheidet der normale Hund nach Fleischfütterung etwa 2,5%, der normale Mensch bei gemischter Kost 2—3% des gesammten Harnstickstoffs in Form von Oxyproteinsäure aus. Nach Pregl's²⁾ Angaben berechnet, stellt sich (entgegen den Erfahrungen Töpfers³⁾) die relative Stickstoffzahl der Oxyproteinsäure im menschlichen Harne auch wohl bis zu 4%, wobei noch zu beachten ist, dass alle Darstellungsmethoden mit hohen Verlusten arbeiten, weil die Substanz die Eigenschaft besitzt, Niederschlägen hartnäckig anzuhaften (Pregl).

Da nach den oben angeführten Versuchen nicht ganz die Hälfte des Oxyproteinsäurestickstoffs, entsprechend etwa $1\frac{1}{2}$ bis 2% des Gesammtharnstickstoffs, in dieser Fraction erscheint, bleibt in derselben immerhin noch ein ungedeckter Rest, dessen Bedeutung weitere Untersuchungen werden aufklären müssen.

Wenn das mitgetheilte Verfahren der quantitativen Bestimmung zu dienen im Stande sein soll, so muss dem Harne beigemengter Amidosäurenstickstoff quantitativ in der vierten Fraction erscheinen. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, fügte ich einem Harne, dessen Stickstoffvertheilung genau bekannt war, eine gewogene Menge Leucin zu und führte die Bestimmung der Fraction f_4 hierauf neuerdings durch.

¹⁾ Centralblatt für medicin. Wissenschaften 1897, Nr. 33. 14. VIII.

²⁾ Pflüger's Archiv 1899, Bd. 75, S. 108.

³⁾ Centralblatt für medicin. Wissenschaften 1897, Nr. 41.

20 ccm. Harn (des Hundes I in normalem Zustande); darin wurde gelöst 0,1 g chemisch reines Leucin.

Stickstoff in der Fraction f_4 : berechnet: 16,52 mg
gefunden: 17,12 »

Der Stickstoff des beigefügten Leucins — von anderen Amidosäuren darf dasselbe Verhalten erwartet werden — erscheint also quantitativ in der betreffenden Fraction.

Nachdem durch die vorgeführten Versuche der Beweis erbracht war, dass die Bestimmung des nicht durch Phosphorwolframsäure fällbaren, nicht durch Phosphorsäure abspaltbaren Stickstoffs im Harn trotz seines kleinen Werthes mit genügender Schärfe durchführbar ist, habe ich versucht, die praktische Verwendbarkeit des Verfahrens an einem experimentell zugänglichen Falle zu prüfen.

Bei gewissen schweren, acuten Infectionen, bei Lebererkrankungen und bei Phosphorvergiftung treten im Harne bekanntlich nicht selten Amidosäuren auf. Unter diesen Verhältnissen ist mithin eine Vermehrung der die vierte Fraction bildenden Stickstoffmenge zu erwarten. Ich denke die Frage nach dem Auftreten von Amidosäuren im Harne unter wechselnden pathologischen Verhältnissen demnächst von der klinischen Seite zu bearbeiten. Vorderhand liegen mir einige Daten betreffend die Stickstoffvertheilung bei der am Hunde erzeugten Phosphorvergiftung vor.

Hund I (s. Tabelle I), kleiner Rattler, erhält am 14. Februar 1 ccm concentrirter öliger Phosphorlösung subcutan injicirt. Am 16. Februar wird die doppelte Dosis in gleicher Weise verabreicht. Ab 19. Februar scheint das Thier schwer krank, erbricht, lahmt. Tod am 20. Februar. Typischer Sectionsbefund; Leberblutungen etc.

Hund II (s. Tabelle II), mittelgrosser Rattler, erhält am 3., 5. und 7. März je 1 ccm. der Phosphorlösung subcutan. Schwerer Allgemeinzustand ab 9. März. Wird moribund geschlachtet. Blut schwer gerinnbar, Leberbefund typisch.

Der Harn beider Thiere wurde in dem sorgfältig gereinigten Käfig quantitativ gesammelt und noch warm zur Verarbeitung gebracht. Die Zahlenangaben in der Tabelle II beziehen sich auf die vereinigten, am letzten Lebenstag entleerten Harnportionen.

Das Ergebniss der Verarbeitung der von den vergifteten Hunden stammenden Harnproben ist auf folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle II.

Direkte Bestimmungen					Indirekte und Kontrollbestimmungen			NH ₃ nach Schließung
Gesamtstickstoff	n ₁	n ₂	f ₁	f ₂	n ₁ + n ₂	f ₁ + f ₂	n ₁ + f ₁	
in 20 ccm. Harn								
Milligramme Stickstoff bzw. Procente vom Gesamtstickstoff								
1. Harn des mit Phosphor vergifteten Hundes I.								
5 ccm. Harn								
86,548					43,876	294,154	300,678	
86,268					44,856	298,074	301,098	
Mittel:	26,432	17,930	280,140	17,556	Mittel: 44,366	Mittel: 296,114	Mittel: 300,888	29,936
86,408	= 7,65 %	= 5,19 %	= 81,06 %	= 5,08 %	= 12,84 %	= 85,68 %	= 87,05 %	= 5,77 %
20 ccm. Harn	342,048 = 98,98 %							
346,632								
2. Harn des mit Phosphor vergifteten Hundes II.								
10 ccm. Harn								
127,498	18,284	indirekt bestimmt	216,748	indirekt bestimmt	23,562	235,200		
128,604	18,692		217,924		24,150	235,760		
Mittel:	18,438	5,418	217,336	18,144	Mittel: 23,856	Mittel: 235,480	14,308	
128,061	= 7,21 %	= 2,12 %	= 84,86 %	= 7,09 %	= 9,32 %	= 91,95 %	= 5,59 %	
20 ccm. Harn	259,336 = 101,28 %							
256,102								

Die auf den Tabellen I und II enthaltenen procentischen Stickstoffwerthe sind — behufs direkter Vergleichbarkeit auf eine Summe der vier Fractionen = 100% corrigirt — in folgender Uebersichtstabelle zusammengestellt.

Generaltabelle.

Stickstoff in Procenten des Gesamtstickstoffs.					
	Fraction n_1	Fraction n_2	Fraction f_1 = $\frac{f_1}{U}$	Fraction f_2	NH ₃
Normaler menschlicher Harn	8,34 14,98	6,65	80,14 85,02	4,88	
Hund I	gesund	7,67 12,77	5,10	84,97 87,23	2,26 4,33
	unter Phosphorwirkung	7,73 12,98	5,24	81,89 87,02	5,13 5,77
Hund II	gesund	7,00 9,24	2,24	86,43 90,76	4,83 4,03
	unter Phosphorwirkung	7,13 9,23	2,10	83,76 90,77	7,01 5,59

Wie ersichtlich, trat in den beiden Fällen von Phosphorvergiftung eine zwar nicht bedeutende, aber gleichmässige Verschiebung der Stickstoffwerthe in dem Sinne ein, dass die Fraction f_2 — ich möchte sie vorläufig die Fraction der Monamidosäuren nennen — auf Kosten des Harnstoffs (f_1) vermehrt erschien. (Auch die Ammoniakwerthe stiegen gleichzeitig etwas an.)

Die absolute Vermehrung des Stickstoffs in der Fraction (f_2) betrug im 24 stündigen Harne in den zwei Fällen bei einer

Gesamttickstoffausscheidung von 6,57 g (Hund I) bzw. 7,76 g (Hund II) 0,19 g bzw. 0,21 g oder — beispielsweise auf Leucin berechnet — 1,76 g bzw. 1,93 g Leucin.

Bei der theilweise¹⁾ noch mangelnden Kenntniss über das Verhalten des der Fraction f_2 im normalen Harne angehörnden Stickstoffs bei Aenderung der Ernährung, im Hunger etc., kann dieser Befund, streng genommen, nicht ohne Weiteres auf abnorme Ausscheidung von Amidosäuren bezogen werden, so sehr ein solcher Schluss auch nahe liegt.

Der qualitative Nachweis von Leucin und Tyrosin mittelst der üblichen Darstellungsmethoden wurde in beiden Phosphorharnen versucht und ergab ein negatives Resultat, was allerdings bei der geringen Empfindlichkeit dieser Methoden ihre Anwesenheit durchaus nicht ausschliesst.

Die bei der direkten Bestimmung der Fraction f_2 gemachten Fehler betragen bei einiger Uebung höchstens etwa ± 2 ccm. $n/10$ -Säure, entsprechend 2,8 mg Stickstoff in 20 ccm. Harn. Vermehrt sich daher in einem Harne der Stickstoffgehalt pro 20 ccm. um etwa 3 mg Amidosäurenstickstoff, so wird dies nach dem angegebenen Fractionirungsverfahren eben sicher nachweisbar sein. In diesem Sinne kann die Methode mit den Methoden des qualitativen Nachweises durch Darstellung von Amidosäuren aus dem Harn in Concurrenz treten.

Für die weitere, namentlich die klinische Verwendung des Verfahrens, ist dasselbe einer Vereinfachung zugänglich. Wurde das präformirte Ammoniak bereits nach Schlösing bestimmt, so kann der Phosphorwolframsäureniederschlag in toto ohne vorgängige Säurezerkochung auf seinen Stickstoffgehalt verarbeitet werden. Die Untersuchung ist dann auf folgende Analysen zurückgeführt:

1. Bestimmung des Gesamttickstoffs;
2. Bestimmung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs;

¹⁾ Nach Bondzynski und Gottlieb findet sich bei Phosphorvergiftung im Hundeharn eine vermehrte Menge von Oxyproteinsäure.

3. Bestimmung des leicht abspaltbaren Stickstoffs aus dem Phosphorwolframsäurefiltrate;

4. Bestimmung des schwer abspaltbaren Stickstoffs aus dem Phosphorwolframsäurefiltrate.

Handelt es sich um rasche Orientirung, so wird 1 und 4 genügen. Es dürfte sich empfehlen, auf diesem Wege zunächst durch längere Versuchsreihen unter wechselnden Bedingungen über die Grenzen, innerhalb deren sich die Werthe für den Stickstoff der « Monamidosäurenfraction » bewegen, einen Ueberblick zu gewinnen.

Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung.

Von

Dr. Meinhard Pfandler aus Graz.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 32.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Gelegentlich seiner Untersuchungen über den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung konnte E. Zunz¹⁾ die überraschende Beobachtung machen, dass «sehr bald nach Beginn der Verdauung ein erheblicher Theil des Eiweissstickstoffes in Form von die Biuretreaction nicht mehr gebenden Körpern abgespalten wird». In Versuchen mit Serumalbumin fand er beispielsweise einmal nach zweistündiger Verdauung 61,14 %, ein anderes Mal nach halbstündiger Verdauung 30,98 %, in Versuchen mit Casein nach vierstündiger Verdauung 50,67 % des Gesamtstickstoffes in solchen Körpern enthalten. Nach der Vermuthung von Zunz stellen sie die Hauptmasse der bei intensiver Pepsinverdauung gebildeten Endprodukte dar.

Die Eigenschaften dieser Körper betreffend ergibt sich aus den von Zunz mitgetheilten Analysen, dass sie zum Theile durch Phosphorwolframsäure fällbar sind und dass dieser fällbare Antheil bei lange fortgesetzter Verdauung beträchtlich zunimmt.

Nach Analogie mit der tryptischen Verdauung und mit anderen hydrolytischen Spaltungen des Eiweisses musste man zunächst wohl vermuthen, dass unter diesen nicht Biuret-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132.

reaction gebenden Endprodukten namentlich die Aminosäuren und Ammoniak vertreten seien.

Ueber das Auftreten des Ammoniaks (bezw. äusserst leicht Ammoniak abspaltender Säureamide) hat bereits E. Zunz quantitative Versuche angestellt, welche die allmähliche Bildung solchen, durch Magnesia als Ammoniak abspaltbaren, «Amidstickstoffes» bei der Pepsinverdauung ausser Zweifel setzen, zugleich aber zeigen, dass seine Menge gegen jene der in Frage stehenden stickstoffhaltigen Endprodukte gering ist.

Betreffs des Auftretens von Aminosäuren und anderer nicht mehr Peptonnatur darbietender Verdauungsprodukte lagen vor Zunz nur vereinzelte, nicht quantitative Angaben anderer Autoren vor. So gibt Hoppe-Seyler¹⁾ auf Grund der Versuche seiner Schüler Lubavin²⁾ und Möhlenfeld³⁾ an, «dass sich bei verlängerter Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit aus Peptonen langsam Leucin, Tyrosin und unbekannte Körper» bilden, und Lawrow⁴⁾ glaubt aus einem seiner Versuche schliessen zu können, dass bei langdauernder, intensiver Verdauung einmal Substanzen entstehen, welchen die Biuret-reaction und Fällbarkeit durch Ammonsulfat abgeht, die aber noch Millon'sche Reaction, Xanthoproteinreaction und Fällbarkeit durch Alcaloidreagentien zeigen, sodann aber auch krystallinische Spaltungsprodukte in nicht unbeträchtlicher Menge.

Diesen Beobachtungen steht die entschiedene Angabe Kühne's⁵⁾ gegenüber, wonach das in solchen Fällen gefundene Leucin und Tyrosin nicht aus Eiweiss durch Pepsinverdauung, sondern aus der Magenschleimhaut oder dem mit Glycerin bereiteten Rohenzyme bei der Auflösung in verdünnten Säuren entstehen. Ebenso erklärt Neumeister,⁶⁾

¹⁾ Physiologische Chemie, Bd. II, S. 228.

²⁾ Hoppe-Seyler, med. chem. Untersuch., S. 452. Vergl. auch Winternitz, diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 464.

³⁾ Pfüger's Archiv, Bd. V, S. 381.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 515, 517.

⁵⁾ Verhandlungen des naturhistor. Vereins Heidelberg, 1876. Ref. Maly, Bd. VI.

⁶⁾ Lehrbuch der physiol. Chemie, I. Aufl., S. 184.

dass die Magenverdauung mit der Bildung von Peptonen, «die noch den allgemeinen Charakter von Proteinsubstanzen tragen», abschliesse.

Da somit die Frage, worum es sich bei den in so grosser Menge auftretenden, nicht Biuretreaction gebenden Körpern von Zunz handele, offen stand, unternahm ich es auf Anregung von Professor Hofmeister, weiteres Material zu ihrer Beantwortung beizuschaffen.

Da in einigen Vorversuchen die Menge des den fraglichen Produkten angehörenden Stickstoffes wesentlich kleiner gefunden wurde, als nach den Angaben von Zunz hätte erwartet werden können, das Auftreten derselben in grösseren Mengen somit an gewisse Bedingungen geknüpft zu sein schien, ergab sich als nächste Aufgabe, diese Bedingungen genauer zu studiren. Als weitere Aufgabe erschien die Entscheidung der Frage, ob die in Rede stehenden Endprodukte den Erfahrungen Hoppe-Seyler's und Lawrow's entsprechend ganz oder doch zum Theile aus einfachen Aminosäuren oder sonstigen krystallinischen Produkten bestehen, oder aber aus complicirteren Substanzen, welche dann nothwendig ihrem chemischen Charakter nach ihren Platz zwischen den «Peptonen» und den Aminosäuren finden müssten.

Aus äusseren Gründen habe ich diese Aufgaben nur in ihren Hauptzügen zu lösen vermocht, die vielversprechende Weiterführung der Untersuchungen aber anderen Händen überlassen müssen.

Ueber das quantitative Auftreten der der Biuretreaction entbehrenden Endprodukte der Pepsinverdauung.

Wie schon aus dem Gesagten hervorgeht, bezeichne ich «als Endprodukte der Pepsinverdauung» nicht mit Kühne und Neumeister die «Peptone» allein, sondern auch die nebenher entstehenden, keine Biuretreaction mehr gebenden Stoffe. Schon aus dem Widerstreite der Meinungen über die Existenz der letzteren geht hervor, dass sie offenbar in sehr wechselnder Menge erhalten werden. Bei näherer Untersuchung ergab sich, dass — wie schon Zunz vermuthungsweise ge-

äussert hat — namentlich die ursprüngliche Concentration des Verdauungsgemisches an Eiweiss von entscheidendem Einflusse ist. Wenig concentrirte Lösungen ergeben eine sehr viel bessere Ausbeute an den in Rede stehenden Substanzen.

Da, wie die Erfahrungen von Zunz lehren, die Menge der bei Pepsinverdauung auftretenden Peptone im Ganzen eine geringe ist und bei länger fortgesetzter Verdauung noch abnimmt, kann der Stickstoffgehalt des nicht aussalzbaren Antheiles des Gemisches als annäherndes Maass für die Menge der darin enthaltenen, nicht Biuretreaction gebenden Körper angesehen werden. In diesem Sinne illustriert folgende Versuchsreihe die eben gemachte Angabe:

Serumeiweissverdauung; Dauer: 3 mal 24 Stunden; Temperatur 35—44° C.;
0,6 % H_2SO_4 ; 0,04 % Pepsin-Grübler.

Anfänglicher Eiweissgehalt des Verdauungsgemenges:	Durch Zinksulfat in saurer Lösung nicht aussalzbarer Stickstoff in Procenten des Gesamtstickstoffes zu Ende des Versuches:
0,48 %	62,9 %
0,88 %	48,1 %
1,75 %	38,8 %
3,50 %.	23,0 %.

Nebst der Eiweissconcentration sind natürlich auch noch andere Umstände, namentlich die Qualität des angewandten Fermentpräparates und die Dauer der Digestion, auf die Menge der gebildeten Endprodukte von Einfluss. Bei monatelanger Verdauung können die Albumosen, wie ich fand, überhaupt bis auf Spuren verschwinden und nur geringe Mengen Pepton neben den der Biuretreaction entbehrenden Produkten zurückbleiben.

Methodisches.

Zur Isolirung der etwa entstandenen Aminosäuren und der keine Biuretreaction mehr darbietenden Produkte war die vorgängige Entfernung der Albumosen und Peptone nothwendig. Die Albumosen konnten durch Aussalzung mit Ammonsulfat (Kühne) oder mit Zinksulfat (Baumann und Bömer) abgeschieden werden. Ich wählte nach dem Vorgange von

Zunz das zweitgenannte Verfahren, da das Zinksulfat einer nachträglichen Entfernung besser zugänglich ist, als das Ammonsulfat.

Zur Beseitigung der Peptone habe ich verschiedene Verfahren angewandt. Zunächst benutzte ich die Ausfällung mit Jod nach E. P. Pick, wobei ich so verfuhr, dass ich die nach Abscheidung der Albumosen erhaltene saure, mit Zinksulfat gesättigte Flüssigkeit mit einer Lösung von Jod in Jodzinksolution völlig ausfällte. Dieses Verfahren erfordert die nachträgliche Entfernung von Jod, Zink, Schwefelsäure und eventuell von Chlor, wenn die Verdauung mit Salzsäure vorgenommen worden war. Durch successive Behandlung mit Aether, Chloroform, Bleioxyd, Silbersulfat, Schwefelwasserstoff und Barythydrat, bezw. Baryumcarbonat lässt sich dies erreichen. Ob mit den sich abscheidenden Peptonperjodiden nicht auch Antheile von unbekannten Endprodukten gefällt werden, ist freilich nicht festgestellt. Die Erfahrung, dass bei der Aussalzung der Albumosen aus den Verdauungsgemischen und bei der Entfernung der Peptone durch Jod grosse Verluste an den nicht die Biuretreaction gebenden Körpern unvermeidlich sind, führte zu Versuchen, letztere auf andere Weise zu isoliren. Aber es bewährte sich weder die zu diesem Behufe angewandte Tanninfällung der höheren Verdauungsprodukte, noch die Fractionirung des in toto benzoylirten Gemenges.

Ich habe daher in einem anderen Versuche nach Aussalzung der Albumosen mit Zinksulfat aus dem Filtrate zunächst das Zink und die Hauptmasse der Schwefelsäure entfernt, dann die Peptone mit einer 10%igen Lösung krystallinischer Phosphorwolframsäure gefällt. Hierbei können allerdings, wie aus den Angaben von Zunz hervorgeht, auch andere, nicht mehr Biuretreaction gebende Körper mit ausfallen.

Einen wesentlichen Vortheil bietet für die Verarbeitung der Verdauungslösungen das Ansetzen der Digestionsmasse mit Schwefelsäure anstatt mit Salzsäure. Kann man die Verdauung überdies so lange währen lassen, dass die Albumosen ganz oder fast ganz verschwinden, was die Behandlung mit Zinksulfat erspart, so ist eine weitere, wichtige Vereinfachung gegeben. Denn hauptsächlich die wiederholte Erzeugung voluminöser und nicht genügend auswaschbarer Niederschläge ist die

Ursache der ausserordentlich hohen Verluste, die man bei der Verarbeitung erleidet, und der Schwierigkeit, zu ausreichenden Mengen isolirter Produkte zu gelangen.

Die von mir ausgeführten Versuche beziehen sich auf die Verdauungsprodukte des Serumalbumins und auf jene des Fibrins.

Endprodukte der Verdauung von Serumalbumin.

Das benützte Serumalbumin war aus Pferdeblutserum nach Aussalzen des Globulins und Fibringlobulins mit einem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung durch Coagulation des Filtrates und Auswaschen des Niederschlages gewonnen. Der Eiweissniederschlag wurde sodann in einem grossen Volumen 1%iger Schwefelsäure vertheilt und die Flüssigkeit mit 3‰ Grüber'schen Pepsins versetzt. Nach mehr als sechsmonatlichem Stehen bei 35—40° C. wurde der spärliche Rest der Albumosen durch Aussalzen mit Zinksulfat entfernt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff und Barythydrat von Zink und der Hauptmasse der Schwefelsäure befreit. Das jetzt nur noch Peptone und Endprodukte enthaltende Filtrat wurde mit Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt. Hierbei ging 59,7% des Gesamtstickstoffes in das Filtrat, 39,7% in den Niederschlag. Letzterer enthielt nebst den nach Zerlegung mit Barythydrat als Baryumverbindungen durch Alkohol fällbaren Peptonen reichlich Ammoniak, daneben Spuren basischer, krystallinische Phosphorwolframate liefernder Substanzen.

Im Filtrat, das keine Biuretreaction mehr aufwies, wurde zunächst zur vorläufigen Orientirung die Stickstoffvertheilung nach dem Hausmann'schen¹⁾ Verfahren untersucht. Der Befund war folgender:

Leicht abspaltbarer Stickstoff (incl. Ammoniakresten)	10,4%
Schwer abspaltbarer, nach Säurezerkochung durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff («Diaminostickstoff»)	34,2%
Schwer abspaltbarer, nach Säurezerkochung durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Stickstoff («Monaminostickstoff»)	54,4%
	<hr/>
des Gesamtstickstoffes.	99,0%

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 595.

Die beträchtliche Menge der letzteren Stickstofffraction liess die Anwesenheit und Nachweisbarkeit von Aminosäuren erwarten. Es konnte jedoch auch bei Verwendung grosser Mengen Ausgangsmaterials weder direkt, noch nach Behandlung mit Alkohol oder Ueberführung in die Kupferverbindung Leucin oder Tyrosin zum Auskrystallisiren gebracht werden. Eben- sowenig gelang es, asparaginsaures Kupfer oder salzsaure Glutaminsäure zu erhalten.

Die auf Aminosäuren ohne Erfolg untersuchten Portionen wurden hierauf vereinigt, von Kupfer befreit, ihre wässerige Lösung bei neutraler Reaction eingedampft und behufs Reinigung von anorganischen Salzen im Soxhlet'schen Apparate mit Alkohol extrahirt. Die in Alkohol übergehende Substanz gab keine Biuretreaction in wässriger Lösung, keine Fällung mit Metallchloriden, Pikrinsäure, Jodquecksilberkalium und anderen Alkaloidreagentien, fiel hingegen ganz oder theilweise aus Wasser durch schwefelsaures oder salpetersaures Quecksilberoxyd, aus Alkohol durch Aether und durch alkoholische Sublimatlösung. Kupferhydroxyd wurde von der wässrigen Lösung in grossen Mengen mit tiefblauer Farbe gelöst; die Millon'sche Reaction war schwach positiv, jene auf locker gebundenen Schwefel negativ. Beim Versuche der Benzoylirung nach Schotten-Baumann wurde ein bei alkalischer Reaction ausfallendes Reactionsprodukt erhalten. Beim Verbrennen trat Leucin-, später Horngeruch auf.

Die Hauptmasse der Substanz wurde behufs Reinigung aus alkoholischer Flüssigkeit mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt, gewaschen, wieder in Wasser gelöst und aus diesem (unter merklichem Verluste) neuerdings durch Alkohol gefällt. Nach Wiederholung dieses Verfahrens stellte die Quecksilberverbindung eine unter dem Mikroskope gleichmässig feinkörnige Masse dar, die im Exsiccator ein weisses Pulver bildete, beim Stehen an der Luft zu einer bräunlichen Masse zusammen- sinterte.

Da gelegentlich der Bestimmung der Stickstoffvertheilung gefunden worden war, dass dieses aus dem Phosphorwolfram- säurefiltrate gewonnene Produkt beim Zerkochen mit Salzsäure

einen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Bestandtheil abspaltet, wurden einige Gramme der gereinigten Quecksilberverbindung mit Schwefelwasserstoff zersetzt und durch acht Stunden mit dem mehrfachen Volumen concentrirter Salzsäure gekocht. Die neutralisirte Flüssigkeit gab mit Phosphorwolframsäure in der That jetzt einen reichlichen, in der Wärme zum grössten Theile löslichen Niederschlag. Niederschlag und Filtrat wurden mit Barytwasser zersetzt.

Aus ersterem gewann ich nach Entfernung von etwas Ammoniak eine schwach alkalisch reagirende Lösung, welche mit Pikrinsäure eine leichte, mit essigsaurem Quecksilberoxyd und Sublimat eine dichte Trübung, mit ammoniakalischer Silberlösung einen flockigen, weissen Niederschlag lieferte. Beim Kochen mit Kupfercarbonat schien sich ein unlösliches, die Flüssigkeit milchig trübendes Kupfersalz zu bilden. Beim Verbrennen war sehr deutlich Horngeruch wahrnehmbar. Dieses Verhalten lässt kaum eine andere Deutung zu, als dass durch das Zerkochen mit Salzsäure eine Diaminosäure (vielleicht Histidin) entstanden war.

Das mit Baryt zerlegte Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlage wurde eingeengt und mit Alkohol extrahirt. In dem minimalen Rückstand liess sich weder Tyrosin noch eine der zweibasischen Aminosäuren nachweisen. Hingegen konnten aus dem Extracte durch Ueberführung in die Kupferverbindung neben anderen nicht identificirbaren organischen Kupferverbindungen mehrere Centigramme Leucinkupfer und aus diesem etwas Leucin mit allen charakteristischen Reactionen gewonnen werden.

Endprodukte der Verdauung des Fibrins.

Ein von der Fabrik Witte in Rostock geliefertes Verdauungsgemisch, durch mehrwöchentliche Digestion von ca. $\frac{1}{2}$ kg Fibrin mit Pepsinsalzsäure erhalten, wird durch totale Aussalzung mit Zinksulfat in saurer Lösung von den Albumosen, durch Fällung mit Jod (in Jodzinklösung) von den Peptonen befreit. Nach Entfernung der Salze und des Jods aus dem Filtrate wird — unter grossen Verlusten an stickstoffhaltiger

Substanz — eine Lösung erhalten, welche keine Biuretreaction mehr gibt und mit Phosphorwolframsäure nicht mehr fällt, hingegen noch deutlich positive Millon'sche Reaction aufweist, mit Kupfercarbonat gekocht grosse Mengen des Metalles löst und nach Zerkochung mit concentrirter Salzsäure auf Phosphorwolframsäurezusatz einen stickstoffhaltigen, in der Wärme löslichen, beim Erkalten theilweise krystallinischen Niederschlag liefert. Die Lösung fällt ferner mit essigsauerm und schwefelsauerm Quecksilberoxyd, nicht mit Bromwasser, und enthält keinen bleischwärenden Schwefel. Beim Verbrennen der eingedickten Masse tritt sehr deutlicher Geruch nach erhitztem Rohleucin auf. Der Nachweis von Leucin gelingt jedoch nicht. Der Versuch wird mit einer grösseren Menge Ausgangsmaterial (etwa 1 kg feuchten Fibrins entsprechend) wiederholt, mit dem einzigen Unterschiede, dass diesmal behufs Entfernung des Schwefelwasserstoffs gelegentlich der Ausfällung der Metalle mehrfach längere Zeit in nicht abgestumpfter schwefelsaurer Lösung gekocht wird. Aus der resultirenden, nicht Biuretreaction gebenden Lösung kann durch schwefelsaures Quecksilberoxyd eine Substanz (oder ein Gemenge von Substanzen) gefällt werden, welche wieder die oben angegebenen Reactionen gibt; doch ist die Ausbeute daran diesmal eine relativ weit geringere. Im Filtrate sind basische, durch Phosphorwolframsäure krystallinisch fällbare Substanzen nachweisbar. Durch fractionirte Aufnahme des eingedampften Filtrates in Methylalkohol und Kochen mit Kupferhydrat lässt sich ferner eine nicht ganz unbeträchtliche Menge von Leucinkupfer gewinnen, das durch die Löslichkeitsverhältnisse, die charakteristische Ausscheidung, Krystallform und den Kupfergehalt (berechnet 19,62%, gefunden 20,26%) als solches erkannt werden kann.

Die erhaltenen Resultate gestatten, die Eingangs gestellten Fragen vorläufig in folgender Weise zu beantworten. Die Frage, ob die der Biuretreaction entbehrenden Endprodukte der Pepsinverdauung ganz oder zum Theil einfache Aminosäuren

sind, kann auf Grund des Serumalbuminversuches nur verneint werden. Denn wenn Leucin und Tyrosin überhaupt Endprodukte der Pepsinverdauung darstellen, so wäre in diesem Versuche, bei sechsmonatlicher Dauer der Digestion, die ja nahezu zum Verschwinden der Albumosen geführt hatte, sicher das Auftreten derselben in beträchtlichen Mengen zu erwarten gewesen. Dass sie nicht gefunden wurden — während der Nachweis des Leucins unter den durch Salzsäure erhaltenen Spaltungsprodukten des Verdauungsrestes ohne Schwierigkeit gelang —, spricht ganz entschieden gegen ihre Bildung bei der Pepsinverdauung. Freilich lässt sich bei den Schwierigkeiten, die sich dem Nachweise der Asparagin- und Glutaminsäure, sowie auch der Diaminosäuren entgegenstellen, dieser Schluss nur mit gewisser Wahrscheinlichkeit auf die übrigen aus Eiweiss erhältlichen Aminosäuren ausdehnen.

Bemerkt muss weiter werden, dass dem Nachweise von Leucin in dem zweiten Fibrinverdauungsversuche keine Beweiskraft gegenüber dem negativen Resultate des Serumalbuminversuches zukommt. Denn einmal ist mir über die Art, wie die Pepsinlösung in diesem Falle fabrikmässig bereitet wurde (ob aus Magenschleimhaut direkt oder aus gereinigtem Pepsin), nichts bekannt,¹⁾ sodann aber besteht der Verdacht, dass das längere Eindampfen der freie Schwefelsäure enthaltenden Lösungen zu einer Spaltung complicirter gebauter, leicht zersetzlicher Endprodukte unter Leucinbildung geführt hat.

In Betreff der Frage nach dem Auftreten solcher Endprodukte, welche sonach nicht den Charakter von einfachen Aminosäuren aufweisen, ist das Ergebniss aller Versuche übereinstimmend positiv. Danach führt die fortgesetzte Pepsinverdauung von Eiweiss zur Bildung von Endprodukten, welche im Moleküle mehr als einen Kohlenstoffkern — bei dem Produkte aus Serumalbumin zum Mindesten den Leucin- und einen Diaminokern — enthalten. Diese Substanzen geben keine Biuretreaction und sind durch

¹⁾ Wie im hiesigen Laboratorium von E. P. Pick gezeigt wurde, enthält das käufliche, durch wenig intensive Verdauung erhaltene Witte-Pepton kleine Mengen Leucin.

Phosphorwolframsäure nicht fällbar; sie stellen eine Stufe zwischen den einfachst gebauten Peptonen und den Aminosäuren dar.

Eine nähere Charakterisirung dieser interessanten Körpergruppe, welche für die Aufklärung des Aufbaues der Eiweisskörper von entscheidender Wichtigkeit sein dürfte, ist bereits im hiesigen Institute von anderer Seite in Angriff genommen.

Die Peptone betreffend füge ich als Nebenbefund meiner Versuche noch an, dass sowohl aus dem Jodniederschlag im Fibrinversuche, als auch aus einem bei späterer Gelegenheit aus der peptischen Lösung des Serumalbumins gewonnenen Tanninniederschlag nebst den von E. P. Pick¹⁾ beschriebenen wasser- und alkohollöslichen Peptonen «A» und «B» ein ätherlösliches Pepton gewonnen wurde. Dasselbe zeichnete sich durch eine ungewöhnlich intensive, rein rothe Biuretreaction aus, gab die Reactionen auf den aromatischen Kern des Eiweisses nur schwach, jene auf Kohlehydratkerne überhaupt nicht. Phosphorwolframsäure erzeugte einen in der Wärme unlöslichen Niederschlag. Mit Quecksilber-, Kupfer- und Eisensalzen entstanden unlösliche Verbindungen, mit Platinchlorid bei langsamem Eindunsten Sphärolithen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 270.

Ueber die Umikoff'sche Reaction in der Frauenmilch.

Von
N. Sieber.

(Aus dem Laboratorium von M. Nencki in St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1900.)

In den Veröffentlichungen der Aerzte des Petersburger Findelhauses, Jahrgang 1898, hat Dr. N. Z. Umikoff¹⁾ eine Reaction beschrieben, mittelst welcher man im Stande ist, das Alter der Frauenmilch, von Beginn der Lactation ab gerechnet, zu bestimmen. Die Reaction besteht darin, dass eine bestimmte Menge, etwa 5 ccm. der zu untersuchenden Milch, mit dem halben Volumen, also 2,5 ccm. 10 %igen wässerigen Ammoniaks versetzt und 15 bis 20 Minuten lang im Wasserbade auf 60° erwärmt wird. Die Milch nimmt dabei eine violett-röthliche Färbung an, und die Nüance ist um so intensiver, je älter die Milch, seit Beginn der Lactation, ist. Kuhmilch, verschiedenen Alters, in gleicher Weise behandelt, nimmt eine gelbe, höchstens gelblichbraune Färbung an, so dass durch diese einfache Reaction sofort die Frauenmilch von der Kuhmilch unterschieden werden kann. Es war nun von Interesse, zu erfahren, durch welchen specifischen Bestandtheil der Frauenmilch diese charakteristische Reaction bedingt ist und ob, ausser der Kuhmilch, die Milch anderer Thierspecies diese Reaction nicht gibt.

Dank der Liebenswürdigkeit des dirigirenden Arztes des Petersburger Findelhauses, Dr. M. D. van Puteren, der mich auf diese Reaction aufmerksam machte und mir Frauenmilch

1) Trudy Wratschej St. Petersburgskaogo wospitatelnaogo doma 1898.

in verschiedenen Lactationsperioden zur Verfügung stellte, wofür ich ihm meinen besten Dank ausspreche, konnte ich zunächst die Richtigkeit der Angaben von Dr. Umikoff bestätigen, und bei der praktischen Bedeutung dieser Reaction habe ich mir zur Aufgabe gestellt, die Ursache sowie die näheren Bedingungen derselben zu ermitteln.

Was den Eintritt und die äusseren Erscheinungen der Reaction betrifft, so wird beim längeren Erwärmen oder höherer Temperatur die Färbung bräunlich; ebenso wenn concentrirteres Ammoniak angewendet wird. Milch, die mehrere Tage, selbst einen Monat gestanden, auch aufgekochte Milch gibt die Reaction. Zusatz von Kochsalz, Soda, Natriumsulfat, nach meiner Beobachtung auch Natriumphosphat und Ammonsulfat, stören die Reaction nicht. Milch, der verschiedene Säuren zugesetzt sind und die dann mit Ammoniak neutralisirt worden ist, färbt sich ebenfalls violettroth. Ein Zusatz von 2—3 Volumen Alkohol schwächt die Färbung ab; bei weiterem Zusatz tritt sie nicht mehr ein, ebenso nach Vermischen mit Aether oder Chloroform, wenn mehr als das gleiche Volumen davon zugesetzt wurde. Zusatz von Salmiak zu der Milch vernichtet die Reaction.

Viel schwieriger war es, das Wesen dieser Reaction aufzuklären. Durch Extraction der neutralen, angesäuerten oder alkalisirten Milch mit Alkohol, Aether, Aceton, Chloroform, Essigäther oder Ligroin war der Stoff, der diese Reaction bedingt, nicht zu isoliren. Ebenso wenig war der entstandene Farbstoff durch die genannten Lösungsmittel, sei es aus alkalischer oder saurer Lösung, extrahirbar. Wurde die Milch mit Metallsalzen oder Tannin gefällt, so gab sowohl der Niederschlag als wie auch das Filtrat, wenn auch schwächer, die Reaction. Das Destillat alkalisirter oder angesäuerter Milch gibt die Reaction nicht. Wird Frauenmilch mit dem halben Volumen 10%iger Kali- oder Natronlauge versetzt, so färbt sich die Milch braun, aber nicht violettroth. Von organischen Basen habe ich folgende bei wechselnder Concentration und Erwärmen geprüft: Aethylamin, Anilin, Dimethylanilin, Pyridin, Pikolin, Piperidin, Nicotin, Chinolin und Benzylamin.

Aethylamin und Piperidin geben orange, Benzylamin

citronengelbe Färbung; die anderen Basen färbten die Milch schwach gelblich oder bräunlich, ebenso auch das Diamid.

Wird Frauenmilch auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit dem ursprünglichen Volumen Wasser wieder aufgenommen, filtrirt, mit dem halben Volumen 10%igen Ammoniaks versetzt und auf 60° erwärmt, so tritt die Umikoff'sche Reaction schärfer und schöner als wie in der ursprünglichen Milch ein. Die Färbung ist schwach rosa, mit einem bläulichen Stich. Wird Milch aus einem Pergamentpapierschlauch gegen destillirtes Wasser dialysirt und das Dialysat mit 10%igem Ammoniak erwärmt, so erhält man damit, ebenfalls schöner und reiner die Umikoff'sche Reaction. Nicht allein mit dem Dialysat der Frauenmilch, sondern auch mit dem der Kuh-, Büffel-, Ziegen- und Schafmilch erhält man jetzt die gleiche Reaction, nur in verschiedener Stärke.

Auch nach Verdunsten der Milch der genannten Thiere und Aufnahme des Rückstandes mit kaltem Wasser verhalten sich die Filtrate wie die von der Frauenmilch. Die violett-rothen Lösungen zeigen im Spectrum keinen Absorptionsstreifen.

Mit der Umikoff'schen Reaction hat sich bereits Dr. Marchetti¹⁾ in Florenz beschäftigt und constatirt, dass das Filtrat von der coagulirten Milch sowie das Dialysat diese Reaction geben. Nach seiner Ansicht ist es der Milchzucker, welcher beim Erwärmen mit Ammoniak die Umikoff'sche Reaction bedingt. Nimmt man Frauenmilch von Individuen von verschiedenen Lactationsperioden, aber gleichem Gehalt an Milchzucker und stellt damit die Umikoff'sche Reaction an, so wird man finden, dass die Milch aus älterer Lactationszeit die Reaction intensiver zeigt. Der Milchzucker ist also hier nicht allein ausschlaggebend. Ich habe diesen Versuch sowohl mit Frauenmilch, als wie auch mit den Dialysaten derselben sehr häufig und stets mit gleichem Resultate angestellt, immer war bei gleichem Gehalt an Milchzucker die Reaction in der älteren Milch intensiver. Ich habe 10 Proben, je 5 ccm. von

¹⁾ Vgl. Maly's Jahresbericht für 1897, S. 266.

1—10%iger wässriger Milchzuckerlösung bereitet, zu jeder Probe 2,5 ccm. 10%igen Ammoniaks zugesetzt und dieselben 20—30 Minuten lang auf 60° erwärmt. Die Lösungen färbten sich röthlich, hatten aber eine andere Nüance als die, welche ich mit Milchzucker nach Ausfällung des Caseins oder mit Milchdialysaten erhalten habe. Der rosaviolette Farbenton fehlte. Erwärmt man dann solche Proben von reinem Milchzucker auf 70° oder 80°, so wird die Färbung nur bräunlicher und noch mehr von der typischen Umikoff'schen Nüance verschieden. Dass andererseits der Milchzucker für das Zustandekommen der Reaction absolut nothwendig ist, geht daraus hervor, dass nach Entfernung desselben aus dem Filtrat oder Dialysat der Milch die Reaction beim Erwärmen mit 10%igem Ammoniak ausbleibt. Es handelte sich nunmehr darum, herauszufinden, welcher andere Bestandtheil der Milch ausser dem Milchzucker für das Zustandekommen der charakteristischen Färbung nothwendig ist.

Dass sowohl Fett wie die Eiweissstoffe der Milch bei dieser Reaction ausser Betracht kommen, geht schon aus dem Umstande hervor, dass die Dialysate nicht allein der Frauen-, sondern auch der Milch der Kuh und anderer Pflanzenfresser die charakteristische Färbung geben. Eher konnte man denken, dass in den differenten Proteinstoffen der Pflanzenfressermilch die Ursache liegt, dass diese Milch nicht die gleiche Färbung wie die Frauenmilch zeigt. Das Nächste war daher, in den Bestandtheilen der Dialysate die beim Erwärmen mit Ammoniak sich violettroth färbenden Substanzen zu suchen.

Um grössere Mengen der Milch zu dialysiren, benutzte ich Schläuche aus Pergamentpapier. Bei kleinen Quantitäten — 10 bis 20 ccm., womit ich namentlich bei Frauenmilch aus verschiedenen Lactationsperioden zu thun hatte — benutzte ich an beiden Enden offene kleine Glasröhren, wovon das eine Ende, zwecks dichten Verschlusses, wulstig abgeschmolzen, mit Pergamentpapier überzogen und mit Bindfaden zugebunden war. Kleine Milchmengen dialysirte ich gewöhnlich gegen das vierfache Volumen destillirten Wassers, grössere — 100 bis 500 ccm. — gegen das doppelte bis dreifache Volumen.

Um die lästige Störung durch die Mikroorganismen zu vermeiden, war es unbedingt nothwendig, die Apparate vorher zu sterilisiren. Der Milch, sowie dem Aussenwasser setzte ich einige Krystalle von Thymol hinzu, nachdem ich mich überzeugt hatte, dass Thymol in wässriger oder ammoniakalischer Lösung auch beim Erwärmen keinen Einfluss auf den Verlauf der Reaction hat. Ich konnte damit sowohl die Milch wie das Dialysat Monate lang vor bakterieller Zersetzung bewahren. Gewöhnlich erhält man im Dialysate die Umikoff-sche Reaction schon am dritten Tage, am stärksten jedoch am achten bis zehnten Tage. In den meisten Fällen dialysirte ich 5 bis 12 Tage lang.

Der Hauptbestandtheil des Dialysates ist, wie zu erwarten war, Milchzucker. In einem Falle, wo ich 200 ccm. Frauenmilch mit 5,5% Zucker gegen 500 ccm. Wasser 10 Tage lang dialysirte, enthielt das Dialysat 1,6% Zucker. Die Aussenflüssigkeit enthielt also ebenso viel davon, wie die Milch. In einem anderen Versuch wurden 100 ccm. Frauenmilch gegen 400 ccm. destillirtes Wasser 8 Tage lang dialysirt. Die Milch enthielt 12,01% festen Rückstand und 0,20% Asche. Das Dialysat hatte das specifische Gewicht 1,0075 und enthielt 1,15% festen Rückstand und 0,045% Asche. Das Dialysat von Frauenmilch gibt mit NO_3Ag keine Trübung. Das von der Kuh- oder Büffelmilch gibt einen Niederschlag von Chlorsilber. Bei der Reaction auf Eisen mit HCl und Ferrocyankalium erhielt ich meistens nur grünliche Färbung.

Von A. B. Macallum¹⁾ wird als das empfindlichste Reagens auf unorganisches Eisen eine 0,5% wässrige Lösung von chemisch reinem Hämatoxylin empfohlen. Die braungelbe Lösung gibt mit Spuren von Eisensalz eine blauschwarze Färbung; organische Eisenverbindungen, wie z. B. Hämoglobin oder Hämatin verändern die Färbung nicht. Das Dialysat von Frauenmilch nach einmonatlicher Lactation gab mit Hämatoxylin keine Färbung; dagegen färbte sich damit blauviolett das Dialysat der Frauenmilch nach einjähriger Lactationszeit.

¹⁾ A. B. Macallum, Journ. of physiol. 22, 92–98. Ref. Malys Jahres-Bericht 1897. Seite 116.

Die Dialysate enthalten die Orthophosphorsäure in leicht durch molybdänsaures Ammoniak nachweisbarer Form.

Von A. Ascoli¹⁾ rührt die Angabe her, dass minimale Mengen von Eisenoxyd, nach H. Rose²⁾ auch Eisenoxydulsalzen, mit Metaphosphorsäure und Ammoniak versetzt, eine portweinrothe Färbung geben. Es war nun denkbar, dass aus dem Nucleon der Milch beim Erwärmen mit Ammoniak nicht Ortho-, sondern Metaphosphorsäure abgespalten sein wird, und geringe Mengen von Eisen sind auch in der Milch vorhanden. Die bei der Einwirkung von Ammoniak auf Milchzucker bei Gegenwart von Metaphosphorsäure und Eisensalz entstehende Färbung konnte eventuell die Nüance der Umikoff'schen Reaction haben. 3% bis 7% Milchzuckerlösung, mit Spuren von Eisensalzen und Metaphosphorsäure versetzt, gaben beim Erwärmen mit 10% Ammoniak nur eine rothbraune Färbung; auch konnte ich in dem Dialysate der Frauenmilch nach der Vorschrift von L. Liebermann³⁾ keine Metaphosphorsäure nachweisen.

Milchfett, so wie flüchtige Fettsäuren und Milchsäure waren ebenfalls ohne Einfluss auf die Reaction. Ein constanter Bestandtheil der Dialysate von Kuh- und Frauenmilch ist die Citronensäure, die wie bekannt von Soldner⁴⁾, Henkel und Soxhlet⁵⁾ und Scheibe⁶⁾ als constanter Bestandtheil der Milch nachgewiesen wurde. Bei Verarbeitung des ganzen Dialysates von 100 ccm. Frauenmilch erhielt ich in einem Falle 0,02, im andern 0,023% Citronensäure auf die verwendeten 100 g Milch berechnet. Wie eben erwähnt, wurde die Citronensäure zuerst von Henkel⁷⁾ als normaler Bestand-

1) A. Ascoli, Ueber die Plasminsäure. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVIII, Seite 430.

2) H. Rose, Ueber die isomeren Modificationen des phosphorsauren Pogg. A. 76. 1879.

3) L. Liebermann, Pflüger's Archiv. 47. 155—165. Ref. in Maly's J. B. für 1891. 775.

4) Landwirthsch. Versuchsstat., Bd. 35. Seite 18.

5) Separatabdruck d. Gesellsch. f. Morphol. und Physiol. in München. Ref. Maly J. B. 1888—94.

6) Landwirthsch. Versuchsstat., 39, 153.

7) Molkereizeitung. 2, 259. Ref. Maly Jahr.-Bericht. 1888. 94.

theil der Kuhmilch nachgewiesen. Nach den späteren Untersuchungen von A. Scheibe ist sie auch ein constanter Bestandtheil der Frauenmilch. Nach seinen Bestimmungen enthält die Kuhmilch zwischen 1,7 bis 2,0‰, die Frauenmilch 0,54 bis 0,57‰ Citronensäure.

Ich fand nun, dass, wenn zu 0,5- bis 8‰igen Milchzuckerlösungen Citronensäure oder citronensaures Natron oder Kalk in der minimalen Menge, wie sie in der Milch vorhanden ist, zugesetzt wird, dann beim Erwärmen mit 10‰igem Ammoniak auf 60° der röthliche Farbenton einen mehr violetten Stich annimmt, ähnlich wie dies in der Frauenmilch bei der Umi-koff'schen Reaction der Fall ist. Bei diesen künstlichen Mischungen von Milchzucker und Citronensäure verblasst die Farbe schon nach einigen Stunden, falls der Zuckergehalt 4‰ und mehr beträgt. Bei geringerem Zuckergehalte hält sich die Farbe über 24 Stunden. In den Milchdialysaten und in der Frauenmilch verblasst sie viel später, manchmal erst am zweiten Tage. Ueber den Citronensäuregehalt der Frauenmilch zu verschiedener Lactationszeit sind keine quantitativen Angaben vorhanden. Da mir hinreichend Frauenmilch von verschiedenen Lactationszeiten zur Verfügung stand, so habe ich darin den Gehalt an Citronensäure nach der Vorschrift von A. Scheibe,¹⁾ so wie auch alle übrigen Bestandtheile quantitativ bestimmt und gebe in nachfolgender Tabelle die erhaltenen Zahlen.

Der Gehalt an Eiweissstoffen wurde direkt durch Fällung der Milch mit Metaphosphorsäure und indirekt aus dem Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.²⁾ Im Filtrate von der Metaphosphor-

1) A. Scheibe, Landwirthschaftl. Versuchsstat. 39, 153.

2) Das Filtrat von der Metaphosphorsäure enthielt zwar noch Spuren einer durch Phosphorwolframsäure und auch durch Tannin fällbaren Substanz; auch sind die Zahlen für den Procentgehalt an Eiweiss durch Multiplication des nach Kjeldahl gefundenen Stickstoffs mit 6,37 ein wenig grösser als wie der direkt gefundene Procenteiweissgehalt. Der Genauigkeit halber habe ich nach der Fällung mit der Metaphosphorsäure das Filtrat vom erhaltenen Niederschlage noch mit Phosphorwolframsäure gefällt und in dem jetzt erhaltenen Niederschlage den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Diese Stickstoffmenge jedoch ist sehr gering. Auf Eiweiss umgerechnet beträgt sie nur 0,1 bis 0,17‰ Eiweiss.

Nr.	Zeit nach der Geburt	In % Trocken- rück- stand	In % Eiweiss direkt bestimmt	In % Eiweiss nach Kjeldahl	In % Fett	In % Milch- zucker	In % Citronensäure	In % Asche	In 100g Asche Eisen	Umkoff'sche Reaction
1.	9 Tage	11,34	1,61	1,70	5,0	4,52	0,035—0,05	0,25	0,13	sehr schwach.
2.	30 Tage	12,08	0,90	1,3	4,91	5,5	0,048	0,24	0,14	desgleichen.
3.	31 Tage	12,0	0,96	1,22	5,1	5,6	0,036—0,04	0,21	0,15	etwas stärker.
4.	35 Tage	11,48	1,00	1,2	4,44	5,45	0,024	0,18	0,13	wie die vorige.
5.	61 Tage	10,81	0,69	0,869	4,58	4,65	0,026—0,04	0,163	0,17	etwas stärker als die vorige.
6.	4 Monate u. 16 Tage	11,2	1,04	1,2	4,52	4,72	0,048	0,177	0,24	ziemlich starke Reaction.
7.	6 Monate u. 4 Tage	11,5	0,79	0,98	5,5	5,0	0,066—0,045	0,139	0,24	sehr stark.
8.	6 Monate u. 13 Tage	12,19	0,77	0,94	4,9	5,54	0,06—0,04	0,429	0,21	etwas schwächer als die vorige.
9.	7 Monate u. 8 Tage	10,6	1,16	1,3	4,5	4,52	0,05	0,119	0,18	gleich wie die letzte.
10.	8 Monate	11,36	1,03	1,25	4,4	5,14	0,055	0,239	0,23	ein wenig schwächer als die letzte.
11.	10 Monate	11,5	0,70	0,88	4,44	5,92	0,07—0,04	0,19	0,2	ziemlich stark.
12.	11 Monate	12,4	0,70	0,95	4,9	6,54	0,03—0,05	0,17	0,12	schwache Färbung.
13.	12 Monate	12,01	0,90	0,98	3,36	7,6	0,04—0,045	0,2	0,18	ziemlich starke Färbung.

säurefällung wurde die Citronensäure und der Milchzucker nach Soxhlet mit der Modification von E. Pfeiffer bestimmt.

Ein abgemessener Theil des Filtrates von der Eiweissfällung wurde nach entsprechender Verdünnung mit überschüssiger Fehlingscher Lösung erhitzt. Das abgeschiedene Kupferoxydul nach dem Trocknen durch Ammoniumnitrat in das Oxyd übergeführt und als solches gewogen.

Fett wurde in 10 ccm. der Milch nach Bondzyński bestimmt. In einem anderen Theil der Milch wurde der Trockenrückstand, Asche und darin der Eisengehalt ermittelt.

Ausser den in der ersten Rubrik der Tabelle mitgetheilten Bestimmungen der Citronensäure habe ich bei anderen Individuen nur Citronensäure bestimmt und die erhaltenen Zahlen unter Citronensäure in der zweiten Rubrik angeführt. Die Bemerkungen über die Umikoff'sche Reaction beziehen sich nicht auf diese Zahlen.

Ich habe vorgezogen, die minimalen Eisenmengen, die ich beim Veraschen von 20 ccm. Milch erhielt, nicht colorimetrisch, sondern gewichtsanalytisch zu bestimmen. Anfangs versuchte ich das Eisen colorimetrisch mit dem Ferrometer von A. Jolles zu bestimmen; ich erhielt aber in der gleichen Milch keine übereinstimmenden Zahlen. In einigen Fällen, hauptsächlich im Anfang der Lactationsperiode, war die Asche nach Schmelzen mit Kaliumbisulfat auch nach Zusatz von Salzsäure trübe; in anderen war die Nüance der Lösung verschieden von der Vergleichslösung des Rhodan ammoniums. Sie hatte keine röthliche, sondern rein gelbe Färbung. Ich halte für solche minimale Eisenmenge die von G. Knorre¹⁾ angegebene Fällung des Eisens als Ferrinitrosonaphtol für zweckmässiger und sind auch alle meine Bestimmungen nach dem Verfahren von G. Knorre ausgeführt worden. Die Milch- asche wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, mit NH_3 übersättigt und auf dem Wasserbade erwärmt. Das nach einigen Stunden abgeschiedene Eisenoxydhydrat wurde abfiltrirt, aus-

1) Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XX, S. 283 und Zeitschr. für analytische Chemie, Bd. XXVIII, S. 234.

gewaschen und von Neuem in Salzsäure gelöst. Aus der salzsauren Lösung wurde dann das Eisen mit der essigsauren Lösung des Nitroso- β -Naphtol gefällt und als Eisenoxyd gewogen.

Bezüglich des Milchzuckers ergeben meine Bestimmungen den höchsten Procentgehalt in den letzten 10 bis 12 Monaten. Der Citronensäuregehalt ist schwankend, zeigt aber die grössten Zahlen in dem 6. bis 11. Monate.

Dass die Intensität der Umikoff'schen Färbung nicht proportional dem Milchzucker ist, geht deutlich aus meinen Bestimmungen hervor. So ist in Nr. 2, 3 und 12 die Farbenreaction schwach, der Zuckergehalt verhältnissmässig stark. Auch geben die Dialysate, die ja nur 1—2% Milchzucker enthalten, die Reaction eben so gut wie die ursprüngliche Milch mit 5—7% Zuckergehalt. Auch in dem Gehalt an Citronensäure und der Stärke der Farbenintensität ist kein Parallelismus vorhanden. Möglicherweise ist der Eisengehalt der Milch für die Reaction der Milch von Bedeutung, zumal wie bekannt Eisenoxyd durch Citronensäure in Lösung gehalten wird.

Ich habe zu 5%iger Milchzuckerlösung in verschiedenen Proben 0,5‰, 1‰, 2‰ und 4‰ Citronensäure, citronensaures Natron resp. citronensauren Kalk zugesetzt. In zwei anderen Röhrchen mit 5% Milchzuckerlösung und 0,5‰ resp. 1‰ Citronensäure wurde die Luft durch Wasserstoff ausgetrieben. In zwei anderen wurde eine Spur Pepton Witte zugesetzt und daneben als Kontrolle 5%ige Milchzuckerlösung aufgestellt. Alle Röhrchen wurden zugleich auf 60° erwärmt. Die Färbung trat in allen Röhrchen etwas später als wie in der Milch resp. Milhdialysaten ein — erst nach 30 bis 45". — Die Kontrollprobe mit Milchzucker allein hatte eine röthliche Färbung. Den stärksten violetten Stich zeigten die Röhrchen mit Peptonzusatz und die, die bei Luftausschluss erwärmt wurden. In den Röhrchen, die bei Luftzutritt mit verschiedenem Citronensäuregehalt erwärmt wurden, war kein auffallender Unterschied bemerkbar. Die Färbung war in allen schwach violettrosa.

Wie bekannt, geben die citronensauren Salze mit Chlorcalcium im Ueberschuss versetzt, einen Niederschlag von

citronensaurem Kalk, der in Kali oder Natron unlöslich ist, dagegen von Salmiaklösung leicht aufgenommen wird. Kocht man die Lösung mit Salmiak, so scheidet sich der citronensaure Kalk in einer darin unlöslichen Form ab. Schon Umikoff gibt an, dass nach Salmiakzusatz die Milch beim Erwärmen mit Ammoniak die Reaction nicht mehr gibt. Die ammoniakhaltige und mit Chlorcalcium versetzte Lösung der Citronensäure gibt alsbald nach dem Erwärmen einen Niederschlag von dem trimetallischen Calciumcitrat. Ich fand in der That, dass Milchdialysat, mit etwas Chlorcalcium versetzt, beim Erwärmen mit Ammoniak die Umikoff'sche Reaction sehr abgeschwächt zeigt. In dem verschiedenen Kalkgehalte der Milch ist wohl auch der Grund zu suchen, weshalb die Kuhmilch die Reaction nicht gibt. Wie G. Bunge¹⁾ gezeigt hat, enthält die Kuhmilch in 100 Gewichtstheilen der Trockensubstanz 1,51 CaO, während die Frauenmilch nur 0,24 g CaO, also 6 Mal weniger davon enthält. Beim Erwärmen der Kuhmilch mit Ammoniak wird die Citronensäure als Kalksalz ausgefällt. Es wäre interessant, nach dieser Richtung hin die Milch von Omnivoren oder Fleischfressern wie z. B. vom Schwein oder Hündin, zu untersuchen. Leider stand mir die Milch dieser Thiere nicht zu Gebote. Wie das Eisenoxyd, so wird auch das Calciumphosphat durch die Citronensäure in Lösung gehalten. Wird nach den Versuchen von L. Vaudin²⁾ frische Milch bei 0° durch Thonfilter filtrirt und dann das Filtrat erhitzt, so scheidet sich das Tricalciumphosphat aus, das sich beim Erkalten wieder löst. Nach Vaudin ist es die Citronensäure, welche als Alkalisalz das Tricalciumphosphat gelöst hält. Gelatinöses Calciumphosphat, durch Fällung einer verdünnten Knochenaschelösung mit Ammoniak und Auswaschen des Niederschlages erhalten, in Alkalicitrat gelöst, verhält sich bei Gegenwart von Lactose gegenüber der Wärme, der Filtration durch Thonzellen etc. wie das in der Milch in

¹⁾ G. Bunge, Lehrbuch der physiolog. und patholog. Chemie, 4. Auflage, 1898, S. 93.

²⁾ L. Vaudin, Ann. de l'Institut Pasteur, Bd. 8, S. 502 u. 856.

Lösung gehaltene Calciumphosphat. Die Kuhmilch, die also 6 Mal mehr Kalk als die Frauenmilch enthält, enthält nur 1—3 Mal mehr Citronensäure als die Frauenmilch. Beim Erwärmen der Kuhmilch mit Ammoniak wird alle Citronensäure daraus als Calciumcitrat neben Calciumphosphat gefällt. In der Frauenmilch dürfte bei dem geringen Gehalte an Kalk ein Theil der Citronensäure in Lösung bleiben resp. einige Metalle in Lösung halten. Die Dialysate der Kuhmilch enthalten jedenfalls weniger Kalk, da ein wesentlicher Theil davon bei dem Eiweiss als phosphorsaurer Kalk zurückbleibt, während die Citronensäure in das Dialysat übergeht, und so erklärt sich die Thatsache, dass die Dialysate der Kuhmilch die Umikoff'sche Reaction geben, während die ganze Milch dies nicht thut.

Auf Grund meiner Beobachtungen erachte ich, dass die Umikoff'sche Reaction nicht allein ein werthvolles Mittel ist, um in einfacher Weise in kürzester Zeit Frauenmilch von der Milch der Kuh und anderer Pflanzenfresser zu unterscheiden, sondern es lässt sich damit die Frauenmilch in den ersten Lactationsmonaten von den späteren, vom 4. bis 8. Monate ab gerechnet, mit ziemlicher Sicherheit diagnosticiren. Vom 8. Monate ab ist die Reaction nicht mehr gleichmässig, indem sie manchmal ganz stark, bei anderen Individuen nur schwach ausfällt.

Zur Kenntniss der menschlichen Chylusflüssigkeit.

Von

Dr. Theodor Panzer, Assistent.

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie der Universität in Wien.)
(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1900.)

Die Fälle sind nicht häufig, in denen Chylusflüssigkeit vom Menschen zur chemischen Untersuchung gelangt. Aus der Litteratur war mir nur ein sicheres Beispiel dafür zugänglich, und zwar die Untersuchung des Secretes einer Chylusfistel am Oberschenkel durch Munk und Rosenstein.¹⁾ Der von Hensen²⁾ veröffentlichte Fall einer Fistel am Präputium eines Knaben bietet keine sichere Gewähr dafür, dass es sich wirklich um Chylus gehandelt habe.

Es dürfte daher nicht überflüssig sein, einige, wenn auch spärliche Daten mitzutheilen, welche die chemische Untersuchung von direkt aus dem ductus thoracicus gewonnenem Chylus lieferte.

Da die klinische Seite des Falles demnächst von berufener Seite gewürdigt werden soll, so mögen hier nur einige kurze Angaben aus der Krankengeschichte folgen. Herr Primarius Dr. Schopf, Direktor des Kaiserin Elisabeth-Spitals in Wien, welcher die Güte hatte, mir die Chylusflüssigkeit zur Verfügung zu stellen, theilt mir darüber Folgendes mit:

A. S., 49 Jahre alt, litt seit einem halben Jahre an einem Carcinoma mammae. Bei der am 26. Januar 1900 vorgenommenen Operation wurde die linke Mamma sammt der die Rippen überlagernden Muskulatur entfernt und aus der Axilla Lymphdrüsen und Fett ausgeräumt. Die

1) Du Bois-Reymonds Archiv. 1890. S. 376 und 581.

2) Pflügers Archiv, Bd. 10, S. 94.

kranken Drüsen konnten entlang den grossen Gefässen bis zur Clavicula verfolgt werden, und in der Tiefe der Supraclaviculargrube tastete man bei bimanueller Untersuchung von der Achselhöhle und vom Halse her ein festsitzendes Drüsenpaket. Die Entfernung der unterhalb der Clavicula gelegenen Drüsen gelang von der Axilla her, die Supraclaviculardrüsen wurden mittelst eines dem Schlüsselbeine parallel laufenden, 1 cm. oberhalb desselben gelegenen Schnittes freigelegt und gleichfalls exstirpiert. Eine Verletzung des ductus thoracicus bei der Operation wurde nicht constatirt.

Der erste Verbandwechsel wurde am 1. Februar vorgenommen. Die Operationswunde, die durch die Mammaexstirpation gesetzt worden war, ist per primam geheilt. In der Supraclaviculargrube hat sich eine fluctuirende Geschwulst gebildet. Durch eine Naht im äusseren Wundwinkel der oberhalb der Clavicula gelegenen Wunde sickert eine milchige Flüssigkeit. Nach Entfernung der Naht und Oeffnung der Wunde im äusseren Wundwinkel entleert sich eine reichliche Menge von vollkommen reinem Chylus. Von nun an zeigt sich täglich der Verband von reichlicher Flüssigkeit durchtränkt. In der ersten Zeit hatte die aus der Wunde hervorquellende Flüssigkeit eine reinweisse Farbe, vom 5. Februar an wurde sie gelblich. Die Wundhöhle, in welcher die Mündung des ductus thoracicus zu sehen ist, granulirt lebhaft.

Die Verluste an Flüssigkeit waren sehr gross, rascher Kräfteverfall, am 14. Februar exitus letalis.

Während des Spitalaufenthaltes genoss die Patientin täglich folgende Nahrung: Morgens Kaffee mit Milch, Mittags Suppe, ein halbes Huhn mit Compot, Nachmittags Kaffee mit Milch, Abends in der Regel nichts, manchmal Schinken, tagsüber drei Semmeln.

Von der Chylusflüssigkeit standen mir, da es die Rücksicht auf die Patientin nicht anders zuliess, nur geringe Mengen zur Verfügung. Dieselben wurden nur während des Verbandwechsels in einem reinen Schälchen aufgefangen, nachdem die Wunde ausgetupft worden war. Kurz nach der Entleerung gerann die Flüssigkeit zu einer dünnen Gallerte, welche nach leichtem Schütteln wieder die frühere dünnflüssige Beschaffenheit annahm.

Die chemische Untersuchung der einzelnen Portionen gab folgende Resultate:

I. Portion vom 4. Februar: 2157 g einer milchartigen, vollkommen farblosen Flüssigkeit von alkalischer Reaction. Dieselbe klärt sich beim Schütteln mit Aether nicht. Unter dem Mikroskope zeigen sich winzige Tröpfchen, grössere, im

Innern granulirte Bläschen und nur wenige Leukocyten und Eiterkörperchen.

In 100 g Flüssigkeit waren enthalten:

Wasser	90,29 g ¹⁾
Feste Stoffe	9,71 "
Organische Substanzen	8,91 "
Anorganische Salze	0,80 "
Coagulirbares Eiweiss	2,16 "
Aetherlösliche Stoffe	6,59 "

Die anorganischen Salze bestanden hauptsächlich aus Chloriden, Sulfaten und Phosphaten von Kalium und Natrium.

Die Eiweisskörper waren hauptsächlich Albumine nebst Spuren von Globulinen, Albumosen, Peptone, Zucker und Lecithin wurden nicht aufgefunden, dagegen Spuren von Oxalsäure.

II. Portion vom 5. Februar: 10,03 g, wie Colostrum aussehend, leicht gelblich. Mikroskopischer Befund wie bei der I. Portion.

100 g Flüssigkeit enthalten:

Wasser	93,96 g ⁴⁾
Feste Stoffe	6,04 "
Organische Substanzen	5,21 "
Anorganische Salze	0,83 "

Die Anwesenheit von diastatischem Fermente⁵⁾ und von Seifen wurde nachgewiesen, Harnstoff und Harnsäure⁶⁾ fehlten.

¹⁾ 1,6722 g Flüssigkeit gaben nach vorsichtigem Eintrocknen bei bis 110° gesteigerter Wärme 0,1624 g Rückstand und nach vorsichtigem Veraschen 0,0134 g Asche.

²⁾ 1,0347 g Flüssigkeit gaben nach dem Ansäuern und Erwärmen auf 100° 0,0223 g trockenes, gereinigtes Coagulum.

³⁾ 3,0631 g Flüssigkeit mit reinem Seesand eingetrocknet, gaben nach mehrtägiger Extraction, 0,2018 g trockenen Aetherextract.

⁴⁾ 1,0032 g Flüssigkeit gaben 0,0606 g Trockenrückstand und 0,0083 g Asche.

⁵⁾ Ein Theil der Flüssigkeit wurde mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde filtrirt, mit Alkohol gewaschen und in einem Rohre in einem Strome von durch Baumwolle filtrirter Luft getrocknet, dann in einer sterilen Eprouvette mit Glycerin ausgezogen und der Glycerinauszug unter aseptischen Cautelen mit frisch bereitetem, geprüft zuckerfreiem Stärkekleister versetzt und auf 38° C. erwärmt. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde erfolgte beim Kochen mit Fehling'scher Lösung deutliche Reduction.

⁶⁾ Nach Salkowsky-Ludwig darzustellen versucht.

III. Portion vom 9. Februar: 30 g, leicht gelb, milchig, alkalisch.

100 g Flüssigkeit enthielten:

Wasser	91,97 g ¹⁾
Feste Stoffe	8,03 »
Organische Substanzen	6,99 »
Anorganische Salze	1,04 »

Zucker konnte nicht nachgewiesen werden.

IV. Portion vom 13. Februar: 7,3 g, milchig, chamoisfarben (durch Anwendung von Jodoformtannin auf die Wunde), alkalisch.

100 g Flüssigkeit enthalten:

Wasser	94,53 g ²⁾
Feste Stoffe	5,47 »
Organische Substanzen	4,53 »
Anorganische Salze	0,94 »

Cholesterin und Neutralfett waren vorhanden, Lecithin, Milchsäure und Oxalsäure wurden nicht aufgefunden.

Es möge die einfache Mittheilung dieser Daten genügen und nur auf die grossen Schwankungen, denen die Concentration der Chylusflüssigkeit unterliegt, hingewiesen werden, welche auch schon von Munk und Rosenstein beobachtet wurden.

1) 2,2640 g Flüssigkeit gaben 0,1818 g Trockenrückstand und 0,0236 g Asche.

2) 0,9259 g Flüssigkeit gaben 0,0507 g Trockensubstanz und 0,0068 g Asche.

Ueber die bei der Behandlung des Harnindicans mit Ferri-chloridsalzsäure auftretenden rothbraunen Farbstoffe.

Von

Jac. Bouma.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Juni 1900.)

Gegen die von mir vertheidigte Meinung, dass bei der Indicanbestimmung nach Obermayer neben Indigoblau in wechselnder Menge auch Indigoroth und Indigobraun gebildet werden,¹⁾ und dass also eine zuverlässige Bestimmung des im Harn vorhandenen Indoxyls nicht zu erreichen ist, wenn, wie von Wang gefordert wird, der Farbstoff vor der Titration mit Chamäleon, mittelst Alkoholätherwasser ausgewaschen wird, hat Wang Einspruch erhoben.²⁾ Erstens hält dieser Forscher es für unwahrscheinlich, dass die rothbraunen Antheile zur Indigogruppe gehörig seien, und zweitens finden sich nach Wang im Chloroformextract des nach Obermayer behandelten Harns auch farblose Substanzen, welche Chamäleon reduciren. Es soll deshalb richtig und nothwendig sein, den Chloroformrückstand bei der quantitativen Bestimmung des Harnindicans in der angegebenen Weise zu reinigen.

In meiner vorigen Mittheilung betonte ich, dass sowohl der braune und der rothe, als der blaue Bestandtheil des Chloroformrückstandes in Bezug auf Löslichkeit und auf spektroskopisches Verhalten von den aus Pflanzenindican bereiteten Indigofarbstoffen nicht zu unterscheiden sind. Ich kann jetzt

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 348.

²⁾ Ibid., Bd. XXVIII, S. 576.

hinzufügen, dass ich auch die Sublimationstemperatur von aus Harn bereitetem Blau und Roth verglichen habe mit der Temperatur, bei welcher «reinstes» Indigoblau und Indigoroth, die ich aus der Bayer'schen Fabrik erhalten habe, sublimiren. Auch in dieser Hinsicht fand ich völlige Uebereinstimmung. In beiden Fällen war die Sublimationstemperatur für den blauen Farbstoff 220° C., für den rothen 190° C. Wenn aber auch zugegeben wird, dass bei der Behandlung nach Obermayer der Harn neben Indigoblau auch Indigoroth und Indigobraun liefert, so ist damit nicht gesagt, dass der Chloroformrückstand nicht noch andere Stoffe enthält, welche das Chamäleon zu reduciren im Stande sind und bei der Titration einen unberechenbaren Fehler veranlassen. Wenn es sich thatsächlich herausstellte, dass dies der Fall sei und also Waschung mit Aetheralkoholwasser, wodurch auch das Roth und das Braun entfernt werden, der Titration vorausgehen muss, so wäre der Werth der Bestimmung sehr geschmälert. Denn es steht, wie ich unten noch an Beispielen zeigen werde, die Menge des gebildeten Indigoblau, bei Menschenharn wenigstens, keineswegs in einem constanten Verhältniss zu dem im Harn vorhandenen Indoxyl. Zur Prüfung der Frage, ob der Chloroformrückstand als ein Gemenge verschiedener reducirender Substanzen zu betrachten sei, habe ich untersucht, wie sich das Gewicht desselben zu dem Reductionsvermögen verhält. Besteht der Rückstand nur aus Indigo, so wird das Resultat der Wägung mit demjenigen der Titrirung übereinstimmen; liegt aber ein Gemenge verschiedener reducirender Stoffe vor, so wird die Menge der verbrauchten Chamäleonlösung den Gewichtsmengen des verwendeten Blau, Roth und Braun nicht proportional sein. Bevor ich meine hierauf Bezug habenden Befunde beschreibe, bemerke ich, dass ich den Harn vor der Behandlung mit dem Obermayer'schen Reagens nicht, wie Wang es vorschreibt, mit neutralem Bleiacetat, sondern mit Bleiessig ausfällte, und zwar so, dass auf je 100 ccm. Harn 10 ccm. der Sol. acet. plumb. bas. hinzugefügt wurden. Auf diese Weise wird u. A. auch die Hippursäure, welche von Wang als eine der Fehlerquellen genannt wird, entfernt. Ich fand dann auch das

Reductionsvermögen des Chloroformrückstandes beim Gebrauch von Bleiessig kleiner als beim Gebrauch des Bleizuckers.

So wurde von normalem Harn ein Theil mit neutralem, ein anderer Theil mit basischem Bleiacetat gefällt. Von beiden Filtraten wurden je 200 ccm. Harn entsprechende Mengen weiter verarbeitet. Der Chloroformrückstand der ersten Portion verbrauchte 5,8 ccm., der Rückstand der mit Bleiessig behandelten 5,3 ccm. der Chamäleonlösung.

Viel schärfer trat der Unterschied hervor beim Vorhandensein von Salicylursäure im Harn.

Herr Prof. Dr. Salkowski hatte die Freundlichkeit, Herrn Prof. Pekelharing darauf aufmerksam zu machen, dass die Anwesenheit dieser Säure im Harn sehr störend wirkt bei der ursprünglich von Wang befolgten Methode.

Als mir dies mitgetheilt wurde, untersuchte ich, ob nicht auch hier vielleicht der Gebrauch des neutralen Bleisalzes den Grund des Fehlers abgeben konnte.

An zwei aufeinander folgenden Tagen gebrauchte ich je 5 g Natriumsalicylat. Der Harn des zweiten Tages, welcher eine starke Salicylursäurereaction gab, wurde gesammelt. Ein Theil desselben wurde mit Bleizuckerlösung, ein anderer Theil mit Bleiessig gefällt und weiter nach Obermayer behandelt. Sobald die Ferrichloridlösung hinzugefügt wurde, zeigte das mit dem neutralen Bleiacetat behandelte Filtrat eine starke Salicylursäurereaction, während die mit dem basischen Salz gefällte Flüssigkeit keine Spur davon bemerken liess. Der Chloroformrückstand einer 200 ccm. Harn entsprechenden Filtratmenge verbrauchte nach Fällung mit Bleizucker 6,7 ccm., nach Fällung mit Bleiessig 5,5 ccm. der Chamäleonlösung. Dann möchte ich noch auf eine andere Fehlerquelle hinweisen. Wenn das Chloroform aus dem Scheidetrichter abgelassen wird, finden sich darin gewöhnlich zahlreiche sehr feine Harntröpfchen. Wird dann das Chloroform sofort abgedampft, so ist der Rückstand mit diesen Tröpfchen, welche vielleicht reducirende Bestandtheile enthalten, verunreinigt. Am besten ist es, das in eine Schale aufgefangene Chloroform einige Zeit sich selbst zu überlassen. Die Harntröpfchen fliessen dann zu grösseren

zusammen und bleiben jetzt beim Abgiessen des Chloroforms an der Wand der Schaafe haften.

Schliesslich bemerke ich, dass ich den Chloroformrückstand zur Entfernung flüchtiger Bestandtheile (wie Phenol) vor der Behandlung mit Schwefelsäure etwa zwei Stunden bei 110° C. getrocknet habe. Verflüchtigung des Indigo ist dabei nicht zu befürchten, nachdem die flüchtigste Modification desselben, das Indigo-roth, erst bei 190° die erste Spur von Sublimation zeigt. Aus dem in dieser Weise behandelten Rückstand konnte mit Wasser weder Farbstoff, noch irgend eine farblose reducirende Substanz ausgezogen werden.

Ich werde jetzt einige Versuche anführen, welche zur Beantwortung der Frage, ob der rothe und der braune Farbstoff auch in dem Reductionsvermögen sich wie Indigo verhalten, angestellt wurden.

Aus einigen Litern Harn wurde das Indigo in der beschriebenen Weise bereitet. Der getrocknete Rückstand wurde erst mit Aether, dann mit Alkohol ausgewaschen. Wie ich früher schon mitgetheilt habe, geht beim Abspülen des Chloroformrückstandes mit Aether nur das Roth in Lösung. Zwar ist auch das Blau einigermaßen in Aether löslich; es wird aber durch das in Aether unlösliche Braun, welches das Blau bedeckt, vor dem Aether geschützt. Man muss sich dabei vor mechanischer Entfernung des Blau hüten. So konnten die drei Farbstoffe gesondert erhalten, abgedampft, auf 110° C. erwärmt (bis kein Gewichtsverlust mehr stattfindet), gewogen, in Schwefelsäure gelöst und mit Chamäleon titirt werden.

I. Aus 5 Liter Harn wurde erhalten:

7,1 mg Roth verbraucht	29,9 ccm. Chamäleon	(11 : 7,1 = 44,3 : 28,6)
6,4 „ Braun „	26,4 „ „	(11 : 6,4 = 44,3 : 25,8)
11,0 „ Blau „	44,3 „ „	

II. Aus 4 Liter Harn:

17,4 mg Roth + Braun verbraucht	41,3 ccm. Chamäleon	(0,6 : 17,4 = 19,3 : 39)
8,6 „ Blau „	19,3 „ „	

III. Aus 3,4 Liter Harn:

11,1 mg Roth verbraucht	25,0 ccm. Chamäleon	(7 : 11,1 = 15,7 : 24,9)
5,4 „ Braun „	14,2 „ „	(7 : 5,4 = 15,7 : 12,1)
7,7 „ Blau „	15,7 „ „	

IV. Aus 4 Liter Harn:

12,0 mg Roth verbraucht	34,4 ccm. Chamäleon	$(5,2 : 12,8 = 13,1 : 32,2)$
0,6 „ Braun „	26,7 „ „	$(5,2 : 0,6 = 13,1 : 21,6)$
5,2 „ Blau „	13,1 „ „	

Die reducirende Kraft des Roth und Braun ist also, wie aus den eingeklammerten Zahlen ersichtlich, derjenigen des Blau ziemlich gleich. Selbstverständlich wurde in jedem Versuch mit derselben Chamäleonlösung titirt.

Die Uebereinstimmung ist nicht vollkommen, dennoch, wie mir scheint, befriedigend. Der Farbenwechsel beim Titiren ist nicht so scharf, dass man jedesmal sicher sein kann, die Grenze ganz genau festgestellt zu haben. Am Ende hat die Flüssigkeit die gelbliche Farbe des Isatin, und es ist oft schwer zu entscheiden, ob eine Spur des blauen oder des braunen Farbstoffs dabei noch vorhanden ist. Mir war es am leichtesten, beim Roth die Endreaction festzustellen. Sind alle drei Farbstoffe zusammen, so hat man nur das Roth, welches nach dem Blau und dem Braun von Chamäleon angegriffen wird, zu berücksichtigen.

Bei der Titrirung von «reinstem», aus der Bayer'schen Fabrik erhaltenen Indigoblau und Indigoroth fand ich ebenso wenig völlige Uebereinstimmung.

Versuch:

30,5 mg Blau verbraucht	86,9 ccm. Chamäleon	$(30,5 : 11,4 = 86,9 : 32,5)$
11,4 „ Roth „	30,6 „ „	

Zwar wurde hier das Reductionsvermögen des Roth, im Verhältniss zu demjenigen des Blau, ein wenig zu schwach gefunden, während beim Harnindigo eben das Gegentheil der Fall war. Das kann aber eine Zufälligkeit sein. Beim Arbeiten mit so verdünnten Lösungen, wie es hier geboten ist, dürfen die gefundenen Unterschiede wohl als innerhalb der Fehlergrenzen gelegen zu betrachten sein.

Der rothe und der braune Farbstoff, welche bei der Oxydation des Harns mittelst Ferrichlorid entstehen, stimmen also in allen Hinsichten, so weit das bis jetzt zu untersuchen möglich war, mit Indigo überein und sind also, meiner Ansicht nach, ebensogut wie das Indigoblau als Oxydations-

produkte des Indoxyls zu betrachten. Die drei Modificationen werden aber, wie ich früher schon bemerkt habe, und wie aus den vorangehenden Zahlen hervorgeht, in meinen Versuchen gar nicht in einem festen gegenseitigen Verhältniss gebildet. Wang führt dagegen an, er habe bei verschiedenen Portionen desselben Harns ziemlich constante Zahlen für das Indigoblau erhalten (nach Auswaschen mit Aetheralkoholwasser).¹⁾ Diese Zahlen beziehen sich aber auf denselben Harn, der in derselben Weise, nur in verschiedenen Mengen, behandelt wurde. Ich muss aber daran festhalten, dass die Art der Behandlung bei demselben Harn und die Art des Harns bei derselben Behandlung auf die relativen Mengen der aus dem Indoxyl entstehenden Farbstoffe Einfluss hat. In meiner vorigen Mittheilung habe ich angegeben, dass schon Erhitzen der Chloroformlösung Indigoblau theilweise in Indigoroth umwandeln werde. Ich muss Wang zugeben, dass ich mich in dieser Angabe geirrt habe. Beim Nachprüfen mit reinem, aus der Bayer'schen Fabrik erhaltenem Indigoblau habe ich diese Angabe nicht bestätigt gefunden.

Dass aber die Temperatur, bei welcher die Oxydation stattfindet, von Einfluss ist, daran muss ich entschieden festhalten. Wang sucht meine früher mitgetheilten hierauf bezüglichlichen Befunde durch die Bemerkung zu erklären, dass dabei die zwischen dem Anfang der Reaction und dem Ausschütteln mit Chloroform verlaufende Zeit viel grösser war bei den bei niedriger Temperatur, als bei den bei 45° C. angestellten Versuchen.²⁾ Dass diese Erklärung nicht zutrifft, geht aus dem folgenden Versuch hervor. 750 ccm. Filtrat von mit Bleiessig behandeltem Harn wurden in 3 gleiche Theile vertheilt. Portion I wurde auf 0° C. abgekühlt und mit 250 ccm. ebenfalls auf 0° C. abgekühltem Obermayer'schem Reagens vermischt. Portion II wurde bei 17° C., Portion III bei 45° C. mit derselben Menge Reagens von gleicher Temperatur wie das Harnfiltrat vermischt. In I stieg die Temperatur bis auf

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 579.

2) l. c. S. 581.

4° C., in II bis auf 22° C. und in III bis auf 54° C. Jede Portion wurde genau 15 Minuten nach dem Zusatz des Reagens mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Ausschütteln wurde noch zweimal mit neuem Chloroform wiederholt. Für alle drei Portionen wurden gleiche Mengen Chloroform verwendet. Ich fand jetzt, nach Lösung des mit Aetheralkoholwasser ausgewaschenen und erhitzten Chloroformrückstandes in Schwefelsäure, mittelst Titration in Portion I 0,6, in Portion II 1,4 und in Portion III 2,7 mg Indigoblau.

Uebrigens habe ich die Angabe Wang's, nach welcher das Stehen der Harnsalzsäuremischung durch kürzere oder längere Zeit von der Chloroformextraction einen Verlust an Indigo bedingt,¹⁾ in meinen Versuchen nicht bestätigt gefunden.

Sechs Portionen desselben Filtrats von mit Bleiessig behandeltem Harn, jede zu 250 ccm., wurden mit dem gleichen Volumen des Obermayer'schen Reagens bei Zimmertemperatur versetzt und nach verschiedener Zeit mit gleichen Mengen Chloroform extrahirt. Die Chloroformrückstände wurden mit Aetheralkoholwasser gewaschen, bei 110° C. erhitzt und in Schwefelsäure gelöst. Das gebildete Indigoblau wurde mittelst Titration bestimmt. Das Ergebniss war:

I. Sogleich	extrahirt	0,3 mg Indigoblau
II. nach 15 Min.	„	1,1 „
III. „ 30 „	„	1,5 „
IV. „ 1 Stunde	„	1,6 „
V. „ 2 Stunden	„	1,6 „
VI. „ 4 „	„	1,6 „

Portion I wurde nach 1 Stunde nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt und lieferte dann noch 1,3 mg Indigoblau. Wang erhielt die grössten Mengen Indigoblau, wenn er sogleich extrahirte.²⁾ Meiner Erfahrung nach ist es also am besten, nach dem Zusatz der Eisenchlorid enthaltenden Salzsäure wenigstens eine halbe Stunde zu warten, bevor die Extraction mit Chloroform vorgenommen wird.

Im Allgemeinen wird bei der Behandlung des Harns mit

¹⁾ l. c. S. 580.

²⁾ l. c. S. 580.

Ferrichloridsalzsäure bei Zimmertemperatur eine sehr deutlich wahrnehmbare Menge Indigoblau gebildet. Bisweilen aber findet sich Harn, welcher in dieser Weise kein oder nahezu kein Indigoblau liefert, so dass die Anwendung der Wang'schen Methode auf beinahe völlige Abwesenheit von Indoxyl schliessen lassen würde. Solchen Harn habe ich öfters unter den Händen gehabt. In den meisten Fällen stammte derselbe von an Chlorose leidenden Mädchen, welche Symptome der Besserung zeigten. Beim Ausschütteln wird dann das Chloroform roth. Dass man in solchen Fällen fehl gehen würde, wenn man daraus schliessen wollte, der Harn sei sehr arm an Indican, geht aus folgendem Beispiel hervor. Mir wurde Harn zur Untersuchung gegeben mit der Mittheilung, dass darin kein Indican nachzuweisen sei. Das Chloroform zeigte nach dem Ausschütteln eine rothe Farbe, ohne merkbare Beimischung von Blau.

Zwei Portionen von je 250 ccm. wurden jetzt in der gewöhnlichen Weise behandelt, I bei Zimmertemperatur, II bei 45° C. Das Chloroformextract von I war roth, der Auszug von II violett. Die Chloroformrückstände wurden mit Aetheralkoholwasser ausgezogen. Von Portion I hinterblieb in der Porcellanschale eine kaum bemerkbare Spur; von Portion II hingegen ein rein blauer Belag, welcher in Schwefelsäure gelöst als Indigoblau titirt werden konnte. Bei Berücksichtigung des gesammten Chloroformrückstandes stellte es sich heraus, dass aus dem in 24 Stunden ausgeschiedenen Harn, welcher Anfangs für so gut wie indoxylfrei erklärt worden war, 4,4 mg Indigo erhalten wurde. Wie ich glaube, liefern solche Fälle den überzeugenden Beweis, dass es unrichtig ist, nur das aus dem Harn gebildete Indigoblau für die Bestimmung des Indicans zu verwenden. Von der Temperatur, bei welcher die Oxydation stattfindet, hängt es ab, ob eine bestimmbare Menge oder nur sich der Bestimmung entziehende Spuren von Indigoblau entstehen.

Selbstverständlich muss ich die Möglichkeit offen lassen, dass es in gewissen Fällen nicht gelingen wird, die aus Harn bereiteten Indigofarbstoffe völlig von anderen reducirenden

Beimischungen zu trennen. Es scheint mir aber aus dem Vorangehenden geschlossen werden zu dürfen, dass für gewöhnlich die Reinigung durch Fällung des Harns mit Bleiessig und Erhitzen des Chloroformrückstandes auf 110° C. wenigstens für praktische Zwecke hinreichend ist. Dass das in Aether lösliche Roth und das in Alkohol und in verdünntem Alkali lösliche Braun Indigofarbstoffe sind, glaube ich nicht nur dieser Löslichkeitsverhältnisse wegen annehmen zu dürfen, sondern auch wegen des spektroskopischen Verhaltens des Reductions- vermögens, ferner weil man es in der Hand hat, durch Aenderung der Temperatur die blaue Modification statt der rothen in den Vordergrund treten zu lassen.

Ueber das durch Pepsin-Salzsäure aus Oxyhämoglobin entstehende Hämatin und Hämochromogen.

Von

Dr. Rich. v. Zeynek.

Mit einer Abbildung.

(Aus dem Laboratorium für medic. Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Juni 1900.)

Aus den nicht unbeträchtlich von einander differirenden Analysenergebnissen mancher nach verschiedenen Methoden dargestellten Hämatine scheint hervorzugehen, dass die Zerreissung des grossen Hämoglobinmoleküls unter Abspaltung des eisenhaltigen Farbcomplexes nicht immer an der gleichen Stelle erfolgt. Neben den Analysendifferenzen zeigen auch manche Hämatine in Bezug auf ihre Löslichkeitsverhältnisse Verschiedenheiten. — Auffallend erscheint, dass eine nahe-
liegende Methode zur Abspaltung des Hämatins aus dem Blutfarbstoff bisher noch nicht verwendet worden ist, die Ablösung des Farbcomplexes durch Verdauung.

Dass im Magen aus dem Blutfarbstoff Hämatin entsteht, ist lange bekannt. Mehr jedoch als die Notirung dieser Beobachtung war mir in der chemischen Litteratur nicht auffindbar. Sollte es gelingen, durch die Pepsinverdauung aus Blutfarbstoff Hämatin darzustellen, so hätte diese Darstellungsart für sich, mit den mildesten Mitteln, einer Säureconcentration, die das Hämatineisen sicher intact lässt, bei relativ niedriger Temperatur und doch unter gleichzeitiger, weitgehender Zerstörung des Eiweisscomplexes die Loslösung des Hämatins zu bewirken; andererseits dürfte die Verfolgung dieses Processes von physiologischem Interesse sein. Ich habe mich mit dem Studium

der Verdauung des Blutfarbstoffs vorerst in der Vorstellung befasst, es werde dadurch, dass die vollständige Lostrennung des Hämatins erst erfolgen dürfte, wenn schon die Eiweisscomponente des Blutfarbstoffes weitgehend zerstört ist, ein möglichst kleines Hämatinmolekül erhalten werden. Unter den Versuchsbedingungen, welche ich eingehalten habe, scheint jedoch die Wirkung der Salzsäure rascher einzutreten, als dieser vorgefassten Meinung entsprach.

Der Verdauung wurden Lösungen von Oxyhämoglobinkristallen aus Pferdeblut unterworfen. Sie waren aus einem Blutkörperchenbrei im Beginne der Fäulniss desselben dargestellt worden und wurden einmal umkrystallisirt. Die Concentration der Oxyhämoglobinslösungen betrug etwa 5%. Die klaren Lösungen wurden mit Sauerstoff gesättigt, hierauf mit so viel Salzsäure versetzt, dass der Salzsäuregehalt 0,2—0,3% betrug; dann wurden sie mit einer Auflösung eines gut wirkenden Pepsinpräparates in 0,4%iger Salzsäure versetzt und bei 38—40° mehrere Tage sich überlassen. Die ursprünglich dünnflüssigen Blutfarbstofflösungen werden bald gallertig dickflüssig; bei mikroskopischer Betrachtung sieht man hellbraune Schollen, daneben kleine schwarze Körner. Nach einiger Zeit wird die zersetzte Blutfarbstofflösung wiederum dünnflüssig. Als keine Consistenzänderung mehr eintrat, wurde die Flüssigkeit mit 0,4%iger Salzsäure stark verdünnt. Es setzte sich nun ein brauner Niederschlag zu Boden. Die über dem Niederschlag befindliche Flüssigkeit ist braun gefärbt, sie enthält nur sehr geringe, durch Ferrocyanium nachweisbare Spuren von Eisen. Mit Ammoniak und Hydrazinhydrat färbt sie sich kirschroth und zeigt ein hämochromogenartiges Spectrum. Der Bodensatz ist nun ein feiner brauner Schlamm von Hämatin, dem wenig grosse hellgelbe Schollen beigemischt sind. Um diese zu lösen, wurde der Hämatinschlamm mit 1%iger Salzsäure verrührt, eine Abspaltung von Eisen, durch Ferrocyanium nachweisbar, erfolgt dadurch nicht.¹⁾ Nachdem bei mikroskopischer Untersuchung dem Schlamme keine Schollen mehr beigemischt gefunden wurden, wurde der Schlamm durch Decantation mit

¹⁾ Vergl. Küster, Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 190.

Wasser gut gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagierte und ungefärbt blieb, hierauf auf einem Filter gesammelt.

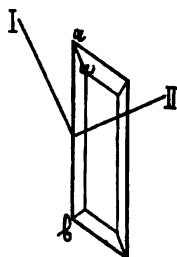
Das so erhaltene Hämatin löst sich wenig in Weingeist, leicht in verdünnten Alkalien. Die Lösungen haben das typische Aussehen von Hämatinlösungen, auf Zusatz von Hydrazinhydrat wird das Hämochromogenspectrum sehr schön erhalten. Da das Hämatinpulver durch sein wenig charakteristisches mikroskopisches Aussehen nicht genügende Sicherheit gibt, eine analysenreine Substanz zu sein, habe ich zur möglichsten Garantie der Reinheit versucht, aus diesem Hämatin Häminkrystalle behufs Ausführung von Elementaranalysen herzustellen.

Als ein sehr brauchbares Verfahren erwies sich, den noch feuchten Schlamm in Aceton zu suspendiren und in kleinen Antheilen gewöhnliche Salzsäure zuzusetzen, etwas mehr, als zur Häminbildung nothwendig ist. Es wurden für 1 g Hämatin ca. 0,06—0,08 g Chlorwasserstoff verwendet. Rasch nach dem Salzsäurezusatz gehen die Hämatinkörner in Lösung, die Flüssigkeit erwärmt sich dabei in geringem Maasse; nach kurzer Zeit beginnt die Ausscheidung von prächtigen mikroskopischen Häminkrystallen, welche nach einigen Stunden beendet zu sein scheint. Die von den Krystallen abgegossene braune Flüssigkeit lässt nach dem Verdünnen mit Wasser noch Krystalle ausfallen, letztere waren aber niemals besonders schön ausgebildet. In der Acetonlösung konnte, wie mehrmals geprüft wurde, durch Ferrocyankalium kein Eisen nachgewiesen werden.

Die ersterwähnten Krystalle sind durchweg sehr schön ausgebildet, niemals verzerrt. Es finden sich Einzelindividuen, etwa von der Form der Krystalle des Doppelspats, ferner Drusen von sternförmig gruppirten Nadeln. Obwohl keine makroskopischen Individuen zu erhalten waren, schien mir eine möglichst genaue krystallographische Untersuchung der Krystalle wünschenswerth. Für die Ausführung derselben bin ich meinem Freund, Herrn Prof. Dr. A. Pelikan, zu besonderem Danke verpflichtet.

Man sieht im Mikroskope säulenförmige Krystalle mit schiefelem Ende, ähnlich wie dies bei den Gypskryställchen der Fall ist. Eine goniometrische Behandlung ist unmöglich, da

die Dimensionen zu gering sind. Die Dicke der Säulchen beträgt ca. 0,01 mm., die Länge das Vier- bis Sechsfache dieses Werthes. Derartige Formen können triklin, monoklin, selbst rhomboedrisch sein. Das letztere scheint das wenigst Wahrscheinliche, da man ab und zu Flächen in der Anordnung wahrnimmt, wie sie in der Figur angedeutet ist. Der Winkel ω beträgt (natürlich gemessen in der Ebene des Tisches) ca. 63° . Die eine Auslöschungsrichtung I bildet mit $a\ b$ einen Winkel von ca. $44\text{—}45^\circ$, die andere II, senkrecht zur ersten, theilt den stumpfen Winkel in zwei Theile mit 71 bzw. 46° . Schwingungsrichtung I ist Axe der kleineren, II ist Axe der grösseren Elasticität. Lichtschwingungen nach I sind dunkelbraun, fast schwarz, wenn die Säulchen etwas dicker werden, solche nach II gelb. —



Der Dichroismus dieser Krystalle ist im Mikroskope an jedem Krystalle schön zu beobachten, wenn die Krystalle auf dem Objectträger bewegt werden; den gleichen Farbenunterschied habe ich auch bei Häminkrystallen gesehen, die nach Schalfesjew dargestellt waren, ohne aber bei einem und demselben Krystall den Farbenwechsel verfolgen zu können.

Die beschriebene typische Krystallisation gelang nicht immer; hie und da wurden auch beim Verdauungshämin kleine würfelförmige Kryställchen erhalten (ähnlich wie Cloetta¹⁾ sie beschreibt). Es schien mir, dass ein zu rascher Zusatz von Salzsäure zur Acetonaufschwemmung des Hämatinschlammes eine derartige Häminausscheidung bewirkt.

Zu den im Folgenden beschriebenen Versuchen sind nur die schön ausgebildeten Krystalle verwendet worden, die von der Mutterlauge getrennt und reichlich mit Wasser gewaschen waren.

Bei der Elementaranalyse der bei $110\text{—}120^\circ$ getrockneten Krystalle wurden folgende Werthe erhalten:

0,1995 g Substanz gaben 0,4457 g Kohlensäure, 0,0960 g Wasser, entsprechend 60,93% Kohlenstoff und 5,35% Wasserstoff.

1) Arch. f. exper. Path. u. Pharmak., Bd. 36, S. 352.

0,1565 g Substanz gaben 0,3482 g Kohlensäure, 0,0739 g Wasser, entsprechend 60,68% Kohlenstoff, 5,25% Wasserstoff.

0,1453 g Substanz, gut mit feinkörnigem Kupferoxyd gemischt, gaben nach Dumas 14,2 ccm. Stickstoff bei 20,2° und 749 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,27% Stickstoff.

0,1355 g Substanz gaben, ebenfalls nach Dumas, 13,7 ccm. Gas bei 21,8° und 746,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,55% Stickstoff.

0,8220 g Substanz, mit 4 g chlorfreiem kohlensauren Natronkali und 1 g in kleinen Antheilen zugefügtem reinen Salpeter geschmolzen, gaben 0,1006 g Eisenoxyd, bei der Chlorbestimmung 0,1587 g Chlorsilber und 0,0028 g metall. Silber, entsprechend 8,57% Eisen und 4,88% Chlor.

0,4194 g Substanz gaben, ebenso behandelt, 0,0490 g Eisenoxyd, 0,0869 g Chlorsilber, 0,0081 g metall. Silber, in Procenten: 8,18% Eisen, 5,37% Chlor.

0,21 g Substanz, mit Soda und Salpeter geschmolzen, gaben eine Schmelze, welche nach dem Lösen in Wasser und folgendem Ansäuern mit Salzsäure auf Chlorbaryumzusatz vollkommen klar blieb.

Das aus etwa 0,54 g Substanz durch Glühen erhaltene Eisenoxyd war vollkommen frei von Phosphorsäure.

Die Analysenwerthe entsprechen etwa einer Formel $C_{34}H_{34}N_5FeClO_4$. Diese verlangt 61,12% Kohlenstoff, 5,09% Wasserstoff, 10,49% Stickstoff, 8,39% Eisen, 5,32% Chlor, 9,59% Sauerstoff.

	Gefunden		Berechnet
C	60,93	60,68	61,12
H	5,35	5,25	5,09
N	11,27	11,55	10,49
Fe	8,57	8,18	8,39
Cl	4,88	5,37	5,32
O	—	—	9,59

Es sind demnach hier Häminkrystalle erhalten worden, welche dem Hämin Hoppe-Seyler's wie Mörner's ähnlich zusammengestellt sind, mit Ausnahme des höheren Stickstoffgehalts, welcher einem Plus an einem Stickstoffatom im Molekül entspricht. In welcher Gruppe dieses Stickstoffatom in dem neuen Hämin enthalten ist, lässt sich vor der Hand nicht sagen, da die Differenzen in der Zahl der Wasserstoffatome durch die Elementaranalyse nicht genügend zum Ausdruck kommen. Dass der höhere Stickstoffgehalt von Verunreinigungen herrühre, dagegen spricht das gleichmässige Aussehen der Krystalle, die Abwesenheit von Schwefel und von Phosphor.

Die Krystalle lösen sich in siedendem Chloroform sehr wenig, in Aether fast gar nicht, etwas leichter in Essigsäureanhydrid, besser löslich, aber noch immer schwer, sind sie in kochendem Weingeist. In keiner dieser Lösungen ist auch nur eine Spur des Hämatoporphyrinspectrums wahrzunehmen. Zum Vergleiche verwendetes Hämin, das im Tübinger Institute für physiologische Chemie aus Pferdeblut nach Schalfjew hergestellt war, löste sich in Essigsäureanhydrid etwas weniger auf, verhielt sich sonst ~~gegen~~ die aufgezählten Lösungsmittel analog. Bei der Destillation der lufttrocknen Krystalle im Wasserdampfstrom konnte kein Aceton im Destillate nachgewiesen werden; der Destillirrückstand reagierte neutral. Durch Kochen mit Laugen wurde eine geringe Menge Ammoniak (mit Nessler's Reagens nachweisbar) abgespalten.

Wie schon erwähnt, gelang nicht immer die typische Krystallisation, hier und da wurden kleine würfelförmige schwarze Krystalle erhalten. Aus Hämatin, welches aus Hämin nach Schalfjew hergestellt war, konnte ich bisher auch keine schönen Häminkrystalle mittelst Aceton und Salzsäure herstellen. Neben wenig kleinen Nadeln wurden schwarzbraune Körnchen erhalten, deren Form für Hämin nicht charakteristisch war. Während Hämin, nach Schalfjew dargestellt, in Aceton und Salzsäure nur sehr wenig löslich ist, löst sich das aus diesem Hämin dargestellte Hämatin reichlich in der Combination der beiden Reagentien zu einer intensiv rothbraunen Flüssigkeit.

Bei Versuchen, durch Trypsinverdauung Hämatin zu erhalten, habe ich kein Resultat erreicht. —

Durch Lösen der Häminkrystalle mit verdünnter Lauge in einer Stöpselflasche und Fällen der Lösung mit verdünnter Schwefelsäure wird ein sehr voluminöser Hämatinniederschlag erhalten; derselbe wurde mit heissem Wasser gut gewaschen. Nach seinem Aussehen ist dieser Niederschlag nicht von dem Hämatinniederschlag anderer Darstellungsmethoden zu unterscheiden.

Die Analysen der reinen Substanz gaben folgende Werthe:

0,1756 g Substanz gaben 0,4009 g Kohlensäure, 0,0868 g Wasser, entsprechend 62,24% Kohlenstoff, 5,49% Wasserstoff.

0,3045 g Substanz gaben 29,3 ccm. Gas bei 15,0° C. und 748,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 11,28% Stickstoff.

0,4823 g Substanz gaben 0,0674 g Eisenoxyd, entsprechend 8,33% Eisen.

Berechnet für	Gefunden
$C_{24}H_{33}N_6FeO_4$	
C 62,87	62,24
H 5,39	5,49
N 10,79	11,28
Fe 8,63	8,33
O 12,33	—

Das so dargestellte Hämatin löst sich nicht in Aether, sehr wenig in Chloroform, etwas mehr in Weingeist; etwas besser löst es sich, als in den vorgenannten Lösungsmitteln, in Essigsäureanhydrid, bedeutend mehr löst Pyridin.

Aus diesem Hämatin habe ich in analoger Weise, wie diese Zeitschrift, Band XXV, Seite 494 ff., beschrieben, Hämochromogenammonium hergestellt. Das Aussehen des Produktes ist das gleiche wie bei dem damals beschriebenen Hämochromogenammonium aus Schalfefjew's Hämin, feucht von der Farbe des rothen Phosphors, braunroth nach dem Trocknen bei 130°.

Bei der Analyse dieses Produktes wurden die folgenden Werthe erhalten:

0,2556 g Substanz gaben 0,0308 g Eisenoxyd, 0,5847 g Kohlensäure, 0,1242 g Wasser; in Procenten 62,39% Kohlenstoff, 5,40% Wasserstoff, 8,44% Eisen.

0,1985 g Substanz gaben 0,0252 g Eisenoxyd, 0,4535 g Kohlensäure, 0,1011 g Wasser; in Procenten 62,32% Kohlenstoff, 5,66% Wasserstoff, 8,87% Eisen.

0,3037 g Substanz gaben nach Dumas 34,8 ccm. Gas bei 14,0° und 737,5 mm. Quecksilberdruck, entsprechend 13,29% Stickstoff.

Es liegt daher hier wie damals die Hämochromogenammoniumverbindung vor.

Wenn die für unser neues Hämatin angenommene Formel als gültig betrachtet wird, so müsste diesem Hämochromogenammonium unter der Annahme, dass ein Sauerstoffatom aus einem Molekül Hämatin austritt, die Formel (a) $C_{24}H_{33}N_6FeO_4$

zukommen; unter der Annahme, dass bei der Hämochromogenbildung zwei Hämatinmoleküle unter Verlust eines Sauerstoffatoms zusammentreten, würde die Formel (b) $C_{68}H_{76}N_{12}Fe_2O_9$ resultiren. In Procenten berechnen sich

	Formel (a)	Formel (b)	Gefunden	
C	62,77	62,01	62,39	62,32
H	5,85	5,77	5,40	5,66
N	12,92	12,77	—	13,29
Fe	8,61	8,51	8,44	8,87
O	9,85	10,94	—	—

Leider ist auch hier eine definitive Entscheidung nicht mit aller Schärfe möglich, obwohl die Werthe etwas besser zu Formel (a) als zu Formel (b) stimmen. Zu einer ganz präzisen Beantwortung der Frage über den Sauerstoffverlust des Hämatins bei der Hämochromogenbildung wird zweckmässig ein anderer Weg als die Elementaranalyse gewählt werden müssen.

Ich habe versucht, ob durch Elektrolyse alkalischer Hämatinlösungen Hämochromogen gebildet werden kann; es ist mir dies bei Verwendung einer Klemmenspannung von 4—10 Volt niemals gelungen, ebensowenig wird dabei Hämatinporphyrin gebildet. Unter Abscheidung von Eisenhydroxyd tritt schliesslich stets eine vollständige Entfärbung der Hämatinlösung ein. Mit der Untersuchung der dabei entstehenden Produkte bin ich beschäftigt. Bis zu dieser Entfärbung kann man an einer herausgenommenen Probe immer noch Hämatin beobachten, das mit Hydrazinhydrat die charakteristische Spectralerscheinung des Hämochromogens gibt. Es scheint der Erwähnung werth zu sein, dass Substanzen, die man als Zersetzungsprodukte des Hämatins ansprechen darf, bei ziemlich starken Reagentienwirkungen, z. B. nach längerem Kochen mit Laugen u. dgl., immer noch mit Hydrazinhydrat das charakteristische Hämochromogenspectrum geben. Nur die Intensität des im Blaugrün gelegenen Absorptionsstreifens unterliegt Schwankungen.

Z. Donogány¹⁾ beschreibt Hämochromogenkrystalle, welche er aus Blut durch Zusatz von Schwefelammon und

¹⁾ Referat im Jahresb. f. Thierchemie, Bd. 27, 150.

Pyridin erhält. H. M. Kobert¹⁾ gibt an, solche Krystalle unter Luftabschluss durch blossen Pyridinzusatz erhalten zu haben. Ich habe nur die Wirkung des Pyridins auf Hämatin untersucht. Sowohl das nach Schalfejew dargestellte Hämatin wie das eben beschriebene lösen sich in kochendem Pyridin leicht auf. Die Lösung zeigt nicht das Spectrum alkalischer Hämatinlösungen, aber auch nicht das Hämochromogenspectrum.

Ebensowenig bewirkt ein Zusatz von Pyridin in wässrigen ammoniakalischen Hämatinlösungen Hämochromogenbildung. Erst wenn zur Hämatin-Pyridinlösung oder zu der wässrigen alkalischen Hämatinlösung, welche mit Pyridin versetzt worden war, eine geringe Menge Hydrazinhydrat zugefügt wird, kann alsbald in diesen Lösungen das schöne Hämochromogenspectrum beobachtet werden, welches auf Zutritt von Sauerstoff verschwindet. Ich theile diese Versuche nur mit, um dem möglichen Irrthum vorzubeugen, dass das Pyridin den Hämochromogen bildenden Reductionsmitteln zugezählt werde.

1) Zeitschr. f. angew. Mikroskopie, 5, 1900.

Ueber das Aldehyde oxydirende Ferment der Leber und Nebenniere.¹⁾

Von

Dr. Martin Jacoby aus Berlin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 33.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

In einer früheren Arbeit²⁾ wurde unter Berücksichtigung der Litteratur ausgeführt, dass man in der Leber eine beträchtliche Zahl von Fermentwirkungen annehmen müsse. Da es klar ist, dass eine genauere Kenntniss der Fermente der Leber und ihrer Wirkungsweise die Vorstellungen über die Function des Organs beeinflussen muss, war es wünschenswerth, sie nach Möglichkeit zu isoliren und die Wirkungen der einzelnen Fermente für sich zu studiren.

In der vorliegenden Arbeit soll über Versuche berichtet werden, welche sich auf das Aldehyde oxydirende Ferment der Leber beziehen.

I. Versuche zur Isolirung des Salicylaldehyd oxydirenden Ferments.

Bei Beginn meiner Untersuchungen lag über diesen Punkt meines Wissens nur die Arbeit Spitzer's³⁾ vor.

1) Der Aufenthalt in Strassburg und die Ausführung der dieser und den folgenden Mittheilungen zu Grunde liegenden kostspieligen Versuche wurde mir durch ein Reisestipendium ermöglicht, welches mir von der Berliner medicinischen Fakultät aus der Gräfin Bose-Stiftung gewährt wurde. Für diese reichliche Zuwendung sage ich meinen ergebensten Dank.

2) Virchow's Archiv, Bd. 157, 1899.

3) Pflüger's Archiv, Bd. 67, 1897.

Spitzer nimmt an, dass die Oxydationsfermente des Organismus einheitlicher Natur, an die Nucleoproteide und im Einzelnen an das in den Nucleoproteiden organisch gebundene Eisen geknüpft sind.

Abelous und Biarnès¹⁾ fanden die Guajakreaction an Globuline gebunden, die sie aus Milz, Lunge und Fibrin isolierten. Die Autoren heben ausdrücklich hervor, dass diese Globuline nicht Salicylaldehyd oxydiren.

Endlich konnte Raudnitz²⁾ aus der Milch durch Aus-salzung Niederschläge erhalten, welche je nach dem metho-dischen Vorgehen Wasserstoffsuperoxyd zersetzten oder Guajak-tinctur bläuten.

Da es mehrere Oxydationsfermente in der Leber gibt, so können wir das Salicylaldehyd oxydirende Ferment der Leber nicht ohne Weiteres als «das Oxydationsferment» be-zeichnen; wir werden daher in Anlehnung an die namentlich von den französischen Autoren ausgebildete Nomenclatur von der Aldehydase der Leber sprechen. Diesen Ausdruck wählen wir als den kürzeren, obschon zunächst noch die Fassung «Salicylaldehydase» angezeigt wäre.

Nunmehr werde ich ein Verfahren zur Isolirung der Aldehydase schildern, das sich nach einigen Vorversuchen als zweckmässig erwies, und im Anschluss daran noch einige Punkte der Methodik besonders besprechen.

Der Nachweis des Vorhandenseins des Fermentes in einer Lösung, resp. die Feststellung aus Salicylaldehyd ge-bildeter Salicylsäure wurde, wie in meiner früheren Arbeit, nach den Angaben von Salkowski³⁾ ausgeführt. Es gelingt auf diese Weise vollkommen sicher, jede Spur von Salicyl-aldehyd zu vertreiben und Salicylsäure auch in sehr kleinen Quantitäten unzweifelhaft nachzuweisen.

1) Arch. de physiologie, 1898.

2) Centralblatt für Physiologie, 1899.

3) Virchow's Archiv, Bd. 147, 1898.

Vom Schlachthaus bezogene frische Rindsleber wird zerhackt, mit Quarzsand¹⁾ zerrieben, der Brei mit destillirtem Wasser, dem Toluol im Ueberschuss zugefügt ist, mindestens einige Stunden stehen gelassen und häufig durchgeschüttelt. Dann wird das Extract vom Rückstand durch Coliren und Filtriren getrennt.

Das so gewonnene dunkle, aber völlig klare Filtrat wird mit so viel gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, dass 25%ige Sättigung mit diesem Salze erreicht wird. Dabei werden hier, wie auch fernerhin immer, wenn Ammonsulfat in Anwendung gezogen wird, so viel Tropfen verdünnter Sodalösung hinzugegan, dass die Flüssigkeit schwach alkalisch reagirt und deutlich nach Ammoniak riecht. In etwa 24 Stunden setzt sich dann allmählich ein geringer Niederschlag ab, der abfiltrirt wird. Das Filtrat wird in gleicher Weise auf 33¹/₃%ige Sättigung mit Salz gebracht, der Niederschlag wiederum nach 24 Stunden durch Filtriren entfernt. Das so erhaltene wasserklare, ziemlich dunkle Filtrat wird auf 60%ige Sättigung mit Ammonsulfat gebracht. Dabei entsteht ein massiger Niederschlag, der sich meistens in 24 Stunden vollständig absetzt.

Dieser Niederschlag, welcher die Aldehydase enthält, wird nach 24 Stunden abfiltrirt, mit entsprechender Salzlösung ausgewaschen und dann in destillirtem Wasser aufgenommen, wobei er sich nur unvollkommen löst. Frühestens nach einigen Stunden wird wiederum filtrirt. Das klare Filtrat wird mit 95%igem Alkohol soweit versetzt, dass gerade ein gut abfiltrirbarer Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag hat sich nach einigen Minuten bereits abgesetzt und wird nun sofort von der Flüssigkeit durch Filtriren getrennt. Es genügt, Alkohol in einer Quantität zuzusetzen, dass die Concentration desselben höchstens 30% beträgt. Der abfiltrirte Niederschlag wird sofort mindestens 5—6 Mal mit kleineren Mengen destillirten Wassers, dem man einige Tropfen verdünnter Sodalösung zu-

¹⁾ Es wurde ein vorzüglicher Quarzsand angewandt, wie er bei dem Buchner'schen Verfahren zur Herstellung von Presssäften benutzt wird.

fügt, extrahirt, die Auszüge werden vereinigt. Am besten lässt man den Niederschlag, um das Ferment möglichst vollständig in Lösung zu bringen, fein vertheilt über Nacht mit Wasser stehen.

Man hat nunmehr bereits eine helle Flüssigkeit, die aber regelmässig noch Eiweiss enthält. Sie wird bei schwach alkalischer, durch Soda hergestellter Reaction mit einer verdünnten Lösung von Uranylacetat bis zum Entstehen einer abfiltrirbaren Trübung gefällt, der Niederschlag ebenso wie der durch Alkoholfällung gewonnene behandelt.

Es resultirt eine wasserklare Flüssigkeit, die kräftig Salicylaldehyd zu Salicylsäure oxydirt.

Hier sei vorläufig nur bemerkt, dass diese Fermentlösung keine der typischen Eiweissreactionen gibt; auf ihr Verhalten wird unten noch eingegangen werden.

Diese Methodik bedarf in einigen Punkten besonderer Besprechung, einmal, weil erst dann einige zunächst unverständliche Complicationen gerechtfertigt erscheinen werden, sodann aber, weil sich einige Eigenschaften des Fermentes bei den auf die Ausarbeitung des Verfahrens hinizielenden Versuchen ermitteln liessen.

Von vornherein muss hervorgehoben werden, dass nicht alle beschriebenen Manipulationen unbedingt nothwendig sind, sondern nur regelmässig ausgeführt wurden, weil so die grösste Sicherheit gegeben schien, ein möglichst isolirtes, hinreichend wirksames Ferment zu erhalten. Andererseits war auch nicht beabsichtigt, das Ausgangsmaterial quantitativ auszunützen, sondern im Interesse der bequemerem Darstellung, sowie der möglichst guten Reinigung wurde an verschiedenen Punkten auf vollständige Ausbeute verzichtet.

Es soll auch nicht verschwiegen werden, dass man infolge der nach einigen Richtungen grossen Empfindlichkeit des Fermentes nicht sicher darauf rechnen kann, bei jeder Darstellung ein wirksames Ferment zu erhalten. Zu beachten ist, dass auch nur vorübergehende Anwesenheit saurer Reaction das Ferment dauernd zerstört, die Verzögerung der Extraction des Fermentes, nachdem es mit Eiweiss zusammen gefällt ist, die nachträgliche Lösung erheblich erschwert.

Das Verreiben des Leberbreies mit Quarzsand wurde in Anwendung gebracht, weil anzunehmen ist, dass nach der so erzielten Zertrümmerung vieler Zellwände die Extraction des Fermentes eine viel ausgiebigere sein kann. Im Verlaufe der Vorversuche war auch versucht worden,

die Buchner'sche Presse zur Extraction zu benutzen. Diese Methode wurde jedoch bald wieder verlassen, da in dem vorliegenden Falle die gehörige Zertrümmerung der Zellwände durch Zerreiben mit möglichst hartem Material ebensoviel leistet wie die Extraction mittelst der Presse.

Als Antisepticum wurde Toluol angewandt. Man hätte zu diesen Versuchen natürlich auch das von Salkowski für Fermentstudien empfohlene Chloroform anwenden können, zumal seine Brauchbarkeit beim Arbeiten mit der Aldehydase bereits erprobt ist. Es erschien jedoch zweckmässig, bei den in dieser Arbeit zu besprechenden Versuchen das im hiesigen Institute nach den verschiedensten Richtungen hin geprüfte Toluol zu benutzen. Das Toluol setzt sich bekanntlich, soweit es im Ueberschuss vorhanden ist, an der Oberfläche der wässerigen Flüssigkeit ab und bildet so eine bei den zahlreichen Manipulationen, denen unsere Fermentlösungen unterworfen werden mussten, willkommene Schutzwehr gegen das Eindringen von Bakterien und namentlich auch von Schimmelpilzen.

Obwohl Täuschungen kaum zu befürchten waren, wurde natürlich besonders festgestellt, dass Toluol in der angewandten Concentration weder die Wirkungen der Aldehydase beeinträchtigt noch vortäuscht.

Auf die Aussalzbarkeit des Fermentes komme ich noch zurück; hier sei nur bemerkt, dass die allmähliche Entfernung der ersten unwirksamen Aussalzungsfraktionen sich als nützlich erwies; es liess sich so leichter vermeiden, dass mit den ersten Niederschlägen das Ferment mitgerissen wurde und in Folge der mangelhaften Auswaschbarkeit der Salzniederschläge auf dem Filter zurückblieb.

Der kleine Sodazusatz zu den Ammonsulfatlösungen wurde eingeführt, weil in den neutralen Lösungen das Ferment bei den Versuchen durchweg zerstört wurde, vermuthlich weil durch Abgeben von Ammoniak leicht saure Reaction auftrat.

Von Metallfällungsmitteln wurde Uranylacetat gewählt, weil Eiweissfällung sich mit diesem Metallsalz bei alkalischer Reaction gut erzielen lässt.

II. Eigenschaften der Aldehydase.

Eine Reihe von Eigenschaften der Aldehydase ergeben sich bereits aus dem bei der Methode besprochenen Verhalten gegen gewisse Reagentien, Anderes musste durch besondere Versuche ermittelt werden.

Das Ferment ist in Wasser klar löslich.¹⁾ Dieser Umstand muss besonders hervorgehoben werden, weil möglicher

¹⁾ Abelous und Biarnès (Arch. de physiol. 1898) fanden ihr guajakbläuendes Ferment in Wasser unlöslich.

Weise in der Zelle das Ferment sich nicht in Wasser gelöst befindet. Namentlich Spitzer¹⁾ hat darauf hingewiesen, wie unvollkommen das Ferment aus dem Gewebe zu extrahiren ist. Wahrscheinlich verhindern die Zellwände das Eindringen des Extractionsmittels, und es ist anzunehmen, dass energische Zertrümmerung derselben wesentlich dazu beiträgt, möglichst viel Ferment in Lösung zu bringen.

Nachdem die Löslichkeit in Wasser sichergestellt war, konnte man erwarten, dass das Ferment auch in Chloroformwasser oder Toluolwasser übergehen würde. Das ergab sich auch in entsprechenden Versuchen.

Die Aldehydase ist aussalzbar. Diese Eigenschaft theilt sie mit vielen Fermenten. Bekanntlich beruhen mehrere Methoden der Fermentisolirung darauf, Niederschläge in den Fermentlösungen herzustellen, mit denen das Ferment niedergelassen wird.

Die Aldehydase wird aber erst bei einer bestimmten Concentration der Salzlösung ausgesalzen (nicht unter 30%iger Sättigung mit Ammonsulfat), und die Aussalzung wird bei einer bestimmten Concentration der Salzlösung vollständig (etwa bei 60%iger Sättigung mit Ammonsulfat).

Die Aldehydase lässt sich also durch fractionirtes Aussalzen von anderen Substanzen trennen. Es ist das keine isolirt dastehende Thatsache. Wohl die älteste hierher gehörende Beobachtung rührt von Paschutin²⁾ her, der die Pankreasenzyme einigermaassen in der Art trennte, dass er das Pankreas mit verschiedenen Salzlösungen extrahirte.

Nachdem von mir das Verhalten der Aldehydase gegen Ammonsulfat bereits festgestellt war, erschien eine vorläufige Mittheilung von Raudnitz³⁾ über die Fermentreactionen der Milch, in der er für die Guajakreaction der Milch mittelst Ammonsulfat ganz bestimmte Fällungsgrenzen (21—29%) fand. Bemerkenswerth ist ferner, dass nach Abelous und

1) Pflüger's Archiv, Bd. LXVII, 1897.

2) Centralblatt für die medic. Wissenschaften 1872.

3) Centralbl. f. Phys. 1899.

Biarnès¹⁾ ihr guajakbläuendes Ferment durch Magnesiumsulfat ausgefällt wird.

Das Ferment dialysirt nicht durch den Pergamentschlauch, wenigstens nicht merklich bei 3—4 tägiger Dialyse gegen fließendes Wasser. Ob es quantitativ zurückgehalten wird, oder ob vielleicht geringe Mengen in der Zeit den Schlauch passiren, wurde nicht untersucht; es wurde lediglich nachgewiesen, dass nach Beendigung der Dialyse reichliche Quantitäten des Fermentes im Schlauch nachweisbar waren. Unsern Befund so vorsichtig auszudrücken, erscheint nothwendig im Hinblick auf eine Arbeit von Chodschajew,²⁾ welcher angibt, dass Invertin, das amylytische Ferment des Malzes, Emulsin, Trypsin und Pepsin — wenn auch langsam — dialysiren. Auf eine Discussion seiner Versuche verzichte ich, da ich sie nicht nachgeprüft habe. Ich möchte nur bemerken, dass sich in meinen Versuchen für seine Hypothese, die er allerdings selbst nicht als die allein mögliche hinstellt — wonach die Fermente wahrscheinlich Albumosen wären —, keinerlei Anhaltspunkte ergaben; im Gegentheil, für das untersuchte Leberferment liess sich diese Annahme sicher ausschliessen.

Von physiologischem Interesse ist der Nachweis, dass auch bei intensiver Durchspülung das Ferment nicht aus der Leber verschwindet. Hierfür kann man bereits aus der Litteratur die Angabe von Spitzer³⁾ anführen, der bei der Darstellung seiner Fermentlösungen vorher die Leber von der Pfortader aus tüchtig mit Wasser ausspülte.

Ich kann dafür folgenden Versuch beibringen:

Ein Hund wird mit Aether tief narkotisirt, der Thorax eröffnet. Allmählich werden im Ganzen 15 Liter 0,7%ige Kochsalzlösung von der Aorta descendens thoracica aus eingeführt. In kurzer Zeit wird die aus der Vena portae ablaufende Flüssigkeit gänzlich farblos. Die Leber ist völlig mit wässriger Flüssigkeit durchtränkt. Der Leberbrei oxydirt reichlich Salicylaldehyd, auch Extracte sind sehr wirksam, ebenso die Lungen des Thieres.

1) Arch. de physiol. 1898.

2) Arch. de physiol. 1898.

3) Pflüger's Arch., Bd. LXVII, 1897.

Diese geringe Diffusibilität des Fermentes steht mit den Befunden von Salkowski¹⁾ und Abelous und Biarnès,²⁾ nach denen das Blut nur verhältnissmässig wenig Aldehyd oxydirt, im Einklang. Würde nämlich das Ferment leicht aus den Organen herausdiffundiren, so wäre zu erwarten, dass man es reichlich im Blut antrifft, ja es würde sogar in den Harn übertreten können. In der Galle konnte ich bei zwei eigenen Versuchen keine Spur von Aldehydase nachweisen. Die Angabe von Portier,³⁾ die Leber enthalte kein oxydatives Ferment, dasselbe werde erst in der Gallenblase gebildet, kann ich also jedenfalls für die Aldehydase nicht bestätigen.

Das Verhalten bei der Dialyse, daneben die Aussalzbarkeit und die Zerstörung durch die Siedehitze entsprechen, wenn auch nicht zwingend, der Annahme, dass es sich um eine colloidale Substanz handelt.

Bei einem Druck von 6 Atmosphären — weniger wurde nicht angewandt — passirte das Ferment das Chamberland'sche Filter, was insofern bemerkenswerth ist, als das in den betreffenden Lösungen befindliche Eiweiss zurückgehalten wurde.

Bezüglich des Verhaltens des Fermentes gegen Alkohol⁴⁾ sei bemerkt, dass bereits bei der ersten Trübung, welche bei der Fällung mit Alkohol auftritt, Ferment mitgefällt wird, dass aber in dünnem Alkohol (etwa 20%igem) die Aldehydase ganz deutlich löslich ist. Nöthig ist es, wie schon ausgeführt, das mit Alkohol gefällte Ferment schnell wieder in Wasser zu lösen, wenn es nicht seine Löslichkeit verlieren soll.

Mit Tannin wird das Ferment ebenfalls gefällt.

In Betreff der Abscheidung mit Uranylacetat sei noch folgende Bemerkung gestattet. Wenn man aus einer ziemlich

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VII, 1882 u. Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1893 und (nach Versuchen von Jamagiwa) 1894.

2) Arch. de physiol. 1898.

3) Thèse de Paris 1898, citirt nach Maly's Jahresb.

4) Bereits Jaquet (Arch. f. exper. Path., Bd. XXIX, 1892) und nach ihm viele Andere haben festgestellt, dass Alkohol das Ferment nicht völlig zerstört und dass man dasselbe mit Alkohol fällen kann.

eiweissarmen Fermentlösung, wie man sie z. B. durch Extraction der Alkoholniederschläge erhält, die Aldehydase und das Eiweiss mit einer Lösung von Uranylacetat bei schwach alkalischer Reaction ausfällt, so entsteht ein nicht sehr voluminöser Niederschlag, der anscheinend in Wasser ganz unlöslich ist. Der wässrige Auszug des Niederschlages sieht farblos aus, während der Niederschlag selbst bei der Extraction nicht in wahrnehmbarer Weise abnimmt. Man erhält so eine wirksame Fermentlösung, die wasserklar, völlig ungefärbt ist und ganz schwach alkalisch reagirt. Beim Kochen, beim Zusatz von Ammonsulfat oder von Essigsäure trübt sich die Flüssigkeit nicht. Die Biuretprobe und die Millon'sche Reaction fallen negativ aus.

Eine derartige Fermentlösung wird bei Zimmertemperatur allmählich von einem Volumen von 2 Liter bis zur Trockene eingeengt. Man erhält einen bräunlichen Rückstand von geringer Quantität, auf dessen Oberfläche sich eine Schicht Krystalle ausscheidet, die sich als Ammonsulfat erweisen. Die Krystalle werden mechanisch durch Abpinseln entfernt, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, wobei er ziemlich vollständig in Lösung geht. Nach dem Filtriren erhält man eine klargelbe Flüssigkeit, die stark sauer reagirt und geruchlos ist. Mit Tannin entsteht eine schwache, aber unzweifelhafte Trübung, deren Auftreten man namentlich unter dem Mikroskop sehr gut beobachten kann, eine starke Trübung entsteht mit Phosphorwolframsäure. Die Lösung enthält noch Ammonsulfat, wie die Reactionen mit Baryumchlorid, Platinchlorid und dem Nessler'schen Reagens anzeigen. Die Biuretprobe und die Millon'sche Reaction sind auch in der sehr eingeengten Lösung negativ.

Nach Alledem ist die Aldehydase ein in Wasser löslicher Körper, der durch die Siedehitze, durch geringe Mengen freier Säure, aber auch durch freies Alkali, anscheinend am wenigsten durch Ammoniak seine oxydirende Wirkung einbüsst. Der Körper wird durch Alkohol, Tannin und Uranylacetat gefällt und kann nach der Alkohol- und Uranfällung wieder in Lösung gebracht werden; er ist mit Ammonsulfat etwa bei ähnlicher

Salzconcentration wie Globulin aussalzbar, ist nicht diffusibel und gibt nicht die für die Eiweisskörper charakteristischen Reactionen, wenigstens nicht in einer Concentration, bei der Salicylaldehyd noch sehr deutlich oxydirt wird.

Danach gewinnt man den Eindruck, dass die Aldehydase eine Colloidsubstanz, aber kein Eiweisskörper ist. Dieses Resultat widerspricht der immer wiederkehrenden Angabe, dass überhaupt Fermente und nach Art von Fermenten wirkende Substanzen Eiweisskörper oder Nucleoproteide darstellen. Doch ist dieser Widerspruch wohl nur ein scheinbarer. Denn es sind bereits mehrfach Fermente oder doch sehr wirksame Fermentlösungen dargestellt worden, welche keine Eiweissreactionen mehr boten. Es sei in der Richtung auf die Isolirung des Speichelfermentes, des Pepsins und des Labfermentes durch Hammarsten¹⁾ und Sundberg²⁾ hingewiesen. Wenn zum Beispiel Sundberg sein Pepsin, das keine Eiweissreactionen gab, stark wirksam fand, so ist es minder gezwungen, anzunehmen, dass Pepsin kein Eiweisskörper ist, als dass die Fermentwirkung als eine besonders feine Reaction dieses Fermenteiweisskörpers anzusehen ist.

Nach Erfahrungen im hiesigen Laboratorium gelingt es auch, hochwirksames Trypsin durch Selbstverdauung von Pankreas zu erhalten, das keine Biuretreaction mehr gibt.

Bei den als Eiweisskörpern beschriebenen Fermenten ist nicht auszuschliessen, dass sie durch Eiweissstoffe verunreinigt waren.

Es ist daran zu erinnern, dass nur unter besonderen Bedingungen die Trennung der Fermente von den Eiweisskörpern sich ermöglichen lässt, da sie durch verschiedene Fällungsmittel ebenso gefällt werden, wie die Eiweisskörper. Diese Eigenschaft theilen sie aber mit anderen bekannten Körpern, die in ihrer Constitution durchaus von den Eiweisskörpern verschieden sind.

Endlich kennt man eine Anzahl verhältnissmässig ein-

¹⁾ Lehrbuch der physiol. Chemie.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, 1885.

facher chemischer Substanzen, welche genau die gleichen Wirkungen wie Fermente entfalten. Speciell von zwei in die Gruppe der Oxydasen zu rechnenden Fermenten wissen wir, dass gleiche Wirkungen auch durch viel einfachere Körper erzielt werden. So konnte Pohl¹⁾ die oxydative Synthese des Indophenols mit Amygdalin, Schaer²⁾ die Bläuung des Guajaks durch Chinon erzielen. Wären derartige Beobachtungen, denen sich auf chemischem Gebiete noch viele an die Seite stellen lassen, bereits früher bekannt gewesen, so würde man bei der chemischen Charakterisirung der Fermente kaum immer in erster Linie an Eiweisskörper gedacht haben.

Dass der colloidale Zustand der Fermente wesentlicher für ihre Wirkung ist als eine constitutionelle Uebereinstimmung mit Eiweisskörpern, dafür sprechen Untersuchungen von Bredig und Müller von Berneck.³⁾ Sie fanden, dass colloidales Platin sehr viel intensiver Wasserstoffsuperoxyd zersetzt als Platinschwamm und sich sehr ähnlich den Fermenten verhält (Blausäureeinwirkung, Einwirkung von Säuren und Alkalien etc.)

Fasst man überhaupt die Fermentwirkungen als katalytische Reactionen auf, so besteht nicht der geringste Grund, in den Fermenten gerade Eiweissstoffe zu vermuthen. Sie können vielmehr den verschiedensten chemischen Gebieten angehören. Sollte sich für bestimmte Fermente mit zwingenden Gründen die Eiweissnatur darthun lassen, so ist noch immer kein Analogieschluss auf andere Fermente gestattet. Jedenfalls darf man verlangen, dass der Beweis für die Eiweissnatur eines Fermentes mit ebenso guten Gründen belegt werden kann, wie bei der Identificirung irgend eines chemischen Körpers — eine Forderung, der die bisherigen Angaben sehr unvollkommen entsprechen.

¹⁾ Arch. f. experim. Path. Bd. 38.

²⁾ Zeitschr. f. Biologie Bd. 37, 1899 (Schaer weist darauf hin, dass er diese Beobachtung bereits 1867 gemacht hat, und ebenfalls 1867 habe Schönbein diesen Befund bestätigt).

³⁾ Zeitschr. f. physikal. Chemie, Bd. 31, 1899.

III. Ueber die Verschiedenheit der einzelnen Oxydationsfermente.

Auf die zuerst von Pohl¹⁾ gefundene, von Spitzer²⁾ bestrittene Verschiedenheit der einzelnen oxydirenden Fermente soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Auch die neueren Beobachtungen anderer Autoren, wie eigene Befunde führen dazu, die bisher beschriebenen Oxydationsfermente als nicht identisch anzusehen.

Aus der Litteratur erwähne ich die Beobachtungen von Abelous und Biarnès,³⁾ welche ihre Globulinoxidase nur in der Milz, im Blut und im Fibrin fanden, nicht aber in der Leber, auch wurde Salicylaldehyd durch ihr Ferment nicht oxydirt. Raudnitz⁴⁾ stellte fest, dass die Milchfermente bei verschiedener Salzconcentration ausgesalzen werden, und dass die katalytische und guajakbläuernde Wirkung der Milch nicht mit der oxydativen Indophenolsynthese identisch ist.

Wiederholt habe ich gefunden, dass die Zerlegung des Wasserstoffsuperoxyds nicht mit der Wirkung der Aldehydase identificirt werden kann. Insbesondere wurde die Wasserstoffsuperoxydreaction trotz ihrer viel grösseren Verbreitung mehrfach in Aldehydaselösungen vermisst.

Ferner konnte ich Pohl's Angabe, dass sich in der Hundeleber die fermentative Indophenolbildung nicht regelmässig nachweisen lässt, durchaus bestätigen. Es gelang mir wenigstens nie, auch nicht in völlig ausgebluteten Lebern (z. B. wurde die oben für den Diffusionsversuch benutzte Leber daraufhin geprüft), eine Beschleunigung der spontanen Indophenolbildung aus seinen Componenten durch Lebersaft oder Leberbrei zu erzielen. Störung durch zu starke Eigenfärbung der Leber konnte ausgeschlossen werden, da auch mit sehr farbstoffarmen Leberlösungen gearbeitet wurde. Ich sah vielmehr regelmässig eine deutliche Verzögerung der Reaction gegenüber dem Kontrollversuch.

1) Arch. f. experim. Path., Bd. 38.

2) Pflüger's Arch., Bd. 67.

3) Arch. de physiolog. 1898.

4) Centralbl. f. Physiol. 1899.

IV. Fermentnatur der Aldehydase.

Obgleich seit Jaquet-Schmiedeberg die oxydativen Agentien des Organismus zumeist als Fermente aufgefasst werden, so fehlt doch noch der eigentlich ausschlaggebende Beweis für die Fermentnatur der Aldehydase. Es kommt darauf an, ob der oxydirende Körper allmählich unbegrenzte Mengen Aldehyd unter geeigneten Bedingungen in Säure überführen kann, ohne selbst bei der Reaction verbraucht zu werden. Der einzige in dieser Richtung von Pohl mit Formaldehyd angestellte Versuch fiel negativ aus. Solange dieser Punkt nicht aufgeklärt ist, fehlt eigentlich die Berechtigung, von einem «oxydativen Ferment» zu sprechen.

Auf Grund neuer Erfahrungen lässt sich diese Unsicherheit beseitigen. Es wurden zwei einschlägige Versuche, beide mit positivem Ergebniss, angestellt.

Versuch: Eine in der oben beschriebenen Weise durch fractionirte Salzfüllung hergestellte Fermentlösung wird bei ganz schwach alkalischer Reaction mit etwas Salicylaldehyd und Toluol 5 Mal 24 Stunden bei ca. 38° digerirt.

In einer Portion der Digestionsflüssigkeit wird Salicylsäure nachgewiesen, der Rest wird 48 Stunden gegen fließendes Wasser dialysirt, bis ein Theil davon keine Spur von Salicylsäure mehr erkennen lässt. Der verbleibende Rest wird mit Salicylaldehyd wie im Anfang digerirt, es wird wieder eine erhebliche Quantität Salicylsäure gefunden.

Versuch: Ein klarer Leberauszug wird wie im vorigen Versuch 48 Stunden digerirt; in einer kleinen Portion wird dann reichlich Salicylsäure nachgewiesen. Die Hauptmenge wird 3 Tage gegen fließendes Wasser dialysirt, der Schlauchinhalt mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag in Wasser aufgenommen. Zwei Drittel hiervon werden, nachdem im Rest keine Salicylsäure nachgewiesen werden konnte, 72 Stunden wie oben mit Salicylaldehyd digerirt. Es wird neuerlich reichlich Salicylsäure gefunden.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Aldehydase bei ihrer oxydativen Wirkung nicht verbraucht wird, somit in der That dem Begriff eines Fermentes entspricht. Der einzige Einwand, der noch möglich wäre, das Ferment wäre zum Theil bei der Reaction verbraucht worden, ein Rest aber übrig geblieben, wird dadurch hinfällig, dass die Menge der gebildeten Salicylsäure dort, wo ich mit reiner Fermentlösung

arbeitete, jedenfalls viel grösser war als das Trockengewicht der benutzten Fermentlösung, wobei noch zu berücksichtigen ist, dass dem Ferment als colloidem Körper ein viel höheres Molekulargewicht zugeschrieben werden muss.

V. Das reichliche Vorkommen einer Aldehydase in der Rinde der Nebenniere.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen, auf die ich in einer späteren Mittheilung zurückkomme, habe ich geprüft, ob die Nebenniere des Rindes eine Aldehydase enthält. Es ergab sich, dass die Rinde sehr intensiv schon in kleinen Quantitäten Salicylaldehyd oxydirt, das Nebennierenmark nur ganz geringfügig. Da es leicht gelingt, die Rinde vom Mark zu befreien, aber es kaum möglich ist, das Mark ganz rindenfrei zu präpariren, so ist es wahrscheinlich, dass auch die Spuren Aldehydase, die sich im Mark nachweisen liessen, der Rinde angehören.

Gekochte Nebennieren waren wirkungslos, ebenso die reducirende, blutdrucksteigernde Substanz des Markes, das von den Höchster Farbwerken nach v. Fürth's Angaben hergestellte Suprarenin.

Ueber die fermentative Elweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber.¹⁾

Von

Dr. Martin Jacoby aus Berlin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 34.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

Bei Gelegenheit der Nachprüfung einer Angabe von Richet hat Loewi²⁾ beobachtet, dass es durch Einwirkung von Leberfermentlösung auf Glycocoll gelingt, eine äther-alkohollösliche Substanz zu gewinnen, welche zwar nicht Harnstoff ist, aber leicht abspaltbaren Stickstoff enthält.

Mit den fermentativen Vorgängen in der Leber beschäftigt, hatte ich die Absicht, die Loewi'sche Beobachtung weiter zu verfolgen und vielleicht jenen äther-alkohollöslichen Körper näher zu charakterisiren. Die Untersuchung nahm jedoch durch einen zufälligen Befund eine andere Richtung an und führte zunächst zur Auffindung eines Ammoniak bildenden Fermentes in der Leber.

I. Ueber fermentative Bildung von durch Magnesia austreibbarem Stickstoff in der Leber.

Da Loewi gefunden hatte, dass seine aus Glycocoll erhaltene äther-alkohollösliche Substanz Stickstoff in ziemlich leicht abspaltbarer Form enthält, so wurde in den ersten Versuchen untersucht, ob nach Digestion von Lebersaft mit Glycocoll mehr beim Kochen mit Magnesia abspaltbarer Stickstoff nachweisbar ist, als wenn man Lebersaft ohne Glycocoll digerirt.

¹⁾ Ausgeführt mit Unterstützung der Stiftung der Gräfin Bose.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV. 1898.

In einer Anzahl von Versuchen, auf deren Wiedergabe ich bei ihrem durchaus negativen Ausfall verzichte, gelang es jedoch weder durch Zusatz von Glycocoll zum Lebersaft, noch durch Zusatz von Globulinlösungen, die aus Leber bereitet wurden, noch durch Hinzufügung von Extracten, die durch Kochen von Leber gewonnen wurden, eine Vermehrung des durch Magnesia austreibbaren Stickstoffs zu erzielen. Es fiel jedoch auf, dass mit Toluol einige Zeit conservirter Lebersaft viel höhere Magnesia-Stickstoffwerthe gab, als frischer, obwohl Fäulniss sicher ausgeschlossen war. Versuche mit Chloroformwasser oder solche, bei denen Chloroform und Toluol combinirt wurden, führten zu denselben Resultaten.

Diese Beobachtung wurde nun durch besondere Versuche sichergestellt. Aus zahlreichen mir vorliegenden Protokollen dieser Art gebe ich hier einige wieder:

Versuchsprotokoll I. Am 31. Januar 1899 Nachmittags 6 Uhr werden 4 gut gefütterte Hunde getödtet. Die sofort herausgenommenen Lebern wiegen zusammen 1140 g. Die Organe werden zerhackt, mit Quarzsand verrieben und mit 1200 ccm. destillirten Wassers, dem Toluol im Ueberschuss zugesetzt wird, übergossen. Das Gemisch wird tüchtig durchgeschüttelt und über Nacht auf Eis gestellt. Am nächsten Vormittag 11½ Uhr wird der Lebersaft abgehebert, 40 Fläschchen mit je 20 ccm. gefüllt, 2 sofort verarbeitet, die übrigen zusammen in denselben Brutschrank gethan, dessen Temperatur meist 38° betrug, jedoch Schwankungen zwischen 30 und 40° ausgesetzt war. Täglich wurden dann je 2 Fläschchen verarbeitet.

Die Bestimmung des mit Magnesia austreibbaren Stickstoffs geschah ganz in der Art, wie Hausmann¹⁾ sie beschrieben hat.

Mit Magnesia austreibbarer Stickstoff wurde gefunden am:

1. Februar	0,0013 g	11. Februar	0,0050 g
2. „	0,0035 „	12. „	0,0045 „
3. „	0,00335 „	13. „	0,0043 „
4. „	0,0037 „	14. „	0,00485 „
5. „	0,0037 „	15. „	0,0045 „
6. „	0,00405 „	16. „	0,00585 „
7. „	0,0046 „	17. „	0,00595 „
8. „	0,00455 „	18. „	0,00595 „
9. „	0,0037 „	20. „	0,00675 „
10. „	0,00475 „		

¹⁾ Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII. 1899.

Versuchsprotokoll II. Am 21. Februar 1899 (8 $\frac{1}{2}$ Uhr Morgens) wird 2 Hunden die Leber entnommen, ihr Gewicht beträgt 800 g. Sie werden zerhackt, mit Sand zerrieben, mit 800 ccm. Toluolwasser extrahirt. Um 10 Uhr Vormittags werden 16 Portionen zu 20 ccm. entnommen, von denen 8 sofort mit Magnesia destillirt wurden, die 8 übrigen, nachdem sie bis zum 7. März bei Brutschranktemperatur gehalten worden waren.

Es fand sich an mit Magnesia austreibbarem Stickstoff am:

21. Februar	7. März
0,0016 g N.	0,0053 g N.
0,0015 „ „	0,0048 „ „
0,0012 „ „	0,0059 „ „
0,0021 „ „	0,0047 „ „
0,0017 „ „	0,0054 „ „
0,0017 „ „	0,0054 „ „
0,0027 „ „	0,0049 „ „
0,0023 „ „	0,0055 „ „

Im Durchschnitt 0,00185 g N. 0,0052 g N.

Nach diesen Versuchen, die aus einer Anzahl entsprechender anderer deshalb ausgewählt wurden, weil sie sich auf die grössten Zahlenreihen stützen, ist es als sicher anzusehen, dass der durch Magnesia austreibbare Stickstoff bei der Digestion von Lebersaft zunimmt.

Es lag nahe, diese Zunahme als einen fermentativen Vorgang aufzufassen, und so wurde geprüft, ob nach vorhergehendem Kochen diese Vermehrung des leicht austreibbaren Stickstoffs unterbleibt.

Das ergab sich in der That:

Versuchsprotokoll III. Am 23. Februar 1899 (8 $\frac{1}{2}$ Uhr Morgens) wird ein grosser Hund getödtet; die Leber, welche 870 g wiegt, wird zerhackt, mit Sand zerrieben und mit 800 ccm. Toluolwasser extrahirt. Um 9 $\frac{1}{2}$ Uhr werden 12 Fläschchen mit je 20 ccm. Lebersaft beschickt, alle Kölbchen aufgekocht, 6 sofort wie in den vorigen Versuchen verarbeitet, 6 bis zum 9. März digerirt.

23. Februar	9. März
0,0010 g N.	0,0018 g N.
0,0014 „ „	0,0015 „ „
0,0015 „ „	0,0022 „ „
0,0012 „ „	0,0015 „ „
0,0013 „ „	0,0010 „ „
0,0013 „ „	0,0016 „ „

Im Durchschnitt 0,00128 g N. 0,0016 g N.

Im gekochten Lebersaft findet also eine merkliche Abspaltung von Amidstickstoff nicht statt.

Da Fermente meistens schlecht diffundiren, so deutet auf die Fermentnatur der beobachteten Erscheinung auch nachfolgender Versuch hin, in dem nach der Dialyse des Lebersaftes noch die Bildung des mit Magnesia austreibbaren Stickstoffes nachweisbar war.

Versuchsprotokoll IV. Frischer, mit Toluol versetzter Hundelebersaft wird 40 Stunden gegen fliessendes Wasser dialysirt. Am Schluss der Dialyse ist noch Toluol im Ueberschuss im Schlauch vorhanden. Von dem Schlauchinhalt werden 8 Portionen zu 20 ccm. abgemessen, zum Theil sofort verarbeitet, zum Theil zur Digestion angesetzt.

Es fand sich Magnesiastickstoff:

31. Mai	13. Juni
0,0003 g N.	0,0016 g N.
0,0006 „ „	0,0019 „ „
0,0007 „ „	0,0017 „ „
<hr/>	<hr/>
Im Durchschnitt 0,0005 g N.	0,0017 g N.

II. Der durch Magnesia austreibbare Stickstoff entspricht zum grossen Theil neugebildetem Ammoniak.

Es war nunmehr zu ermitteln, welcher Natur der bei der Digestion entstehende Körper ist, der beim Kochen mit Magnesia Ammoniak abspaltet.

Aus den angeführten Zahlen geht hervor, dass sich entsprechend nachweisbarer Stickstoff bereits in der Leber des eben getödteten Thieres findet. Dass er hier nur in geringer Quantität vorhanden, ist verständlich, wenn man sich überlegt, dass es sich wohl nur um sehr leicht diffusible Substanzen handeln kann, welche in den Organen nicht zur Anhäufung gelangen. Da vermuthlich dieser in der Leber sich findende, mit Magnesia direkt austreibbare Stickstoff verschiedenen Substanzen entstammt, so wäre es schwierig, dieselben im Einzelnen festzustellen, und würde es dazu einer besonderen Untersuchung bedürfen. Für unsere Frage ist dieser Punkt im Augenblick weniger dringlich. Es dürfte daher genügen, nur kurz auf jene Stoffe hinzuweisen, an die zunächst zu denken ist.

Es ist bekannt, dass sich geringe Ammoniakmengen in der frischen Leber finden; sie müssen in unseren Zahlen mit zum Ausdruck kommen. Ferner ist der Harnstoff betheilig, der nach Gottlieb¹⁾ sich in der Leber, wenn auch nur in geringer Quantität, nachweisen lässt.²⁾

Bei der Frage, was für einem Körper der durch Digestion abgespaltene Stickstoff angehört, kommt Harnstoff nicht in Betracht, da ja Loewi unter ähnlichen Verhältnissen die Bildung von Harnstoff vermisste und Gottlieb mit der Oxalsäuremethode auch quantitativ keine Harnstoffzunahme beobachten konnte.

Auch der äther-alkohollösliche Körper Loewi's ist auszuschliessen. Dass es sich um ihn handeln könnte, war von vorneherein unwahrscheinlich, weil bei der Moerner-Sjoequist'schen Methode, mit der Loewi gearbeitet hatte, vor der Aetheralkoholextraction der Theil des Stickstoffs entfernt wird, welcher bei 40° mit Magnesia zu vertreiben ist. Sicher ausschliessen konnte ich den Loewi'schen Körper deshalb, weil ich bei Versuchen mit Glycocollzusatz keine Mehrbildung von Amidstickstoff nachweisen konnte.

Schliesslich konnte es sich um Ammoniak³⁾ handeln, was sich auch durch Versuche, in denen die Magnesiamethode und die Schlösing'sche nebeneinander benutzt wurden, sicherstellen liess.

Versuchsprotokoll V. Frischer Lebersaft vom Hund wird am 25. IV. 1899 mit Magnesia destillirt und Kontrollproben 5 Tage nach Schlösing mit Kalkmilch behandelt. Ebenso wird mit einer Anzahl

1) Arch. f. exper. Pathol., Bd. XLII. 1899.

2) Harnstoff zerlegt sich beim Kochen mit Wasser, ob Magnesia zugegen ist oder nicht (vergl. Salaskin und Zaleski, diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 76). Ich habe bei vielstündigem Kochen von Harnstoff mit Magnesia etwa die Hälfte des Stickstoffs im Destillat nachweisen können; wahrscheinlich lässt sich bei noch längerer Einwirkung von Wasser auf Harnstoff in Gegenwart von Magnesia die Spaltung noch weitertreiben. Jedenfalls ist anzunehmen, dass ein Theil unserer kleinen Anfangswerthe vom Harnstoff her stammt.

3) Bezw. um sehr leicht zersetzliche Säureamide. — Wir besitzen zur Zeit keine Methode, um diese von Ammoniak sicher zu trennen.

Proben am 9. V. 1899 verfahren, nachdem ein Aufenthalt im Brutschrank unter Toluolzusatz vorausgegangen war.

Magnesiawerthe:	Schlösingwerthe:
Vor der Digestion (25. IV.):	
0,0009 g N	0,0001 g N
0,0013 „ „	— 0,0003 „ „
0,0018 „ „	0,0000 „ „
0,0008 „ „	0,0003 „ „
Durchschnitt 0,0011 g N	0,0000 g N.
Nach der Digestion (9. V.):	
0,0019 g N	0,0014 g N
0,0017 „ „	0,0009 „ „
0,0025 „ „	0,0007 „ „
0,0019 „ „	0,0010 „ „
0,0020 g N	0,0010 g N.

Versuchsprotokoll VI wie voriges.

Magnesiawerthe:	Schlösingwerthe:
Vor der Digestion (29. V. 1899):	
0,0009 g N	0,0006 g N
0,0013 „ „	0,0008 „ „
0,0010 „ „	0,0005 „ „
0,0011 g N	0,0006 g N
Nach der Digestion (19. VI. 1899):	
0,0013 g N	0,0009 g N
0,0024 g „	0,0013 „ „
0,0027 „ „	0,0014 „ „
0,0021 g N	0,0012 g N.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, dass Ammoniak bei der Digestion des Lebersaftes entsteht und die Zunahme der Magnesiawerthe mindestens zum Theil darauf zu beziehen ist.

Fermentative Ammoniakbildung innerhalb der thierischen Zellen oder überhaupt das Vorkommen von ammoniakabspaltenden Fermenten in den thierischen Zellsäften ist meines Wissens bisher nicht beschrieben worden, auch über die Verdauungsfermente ist in dieser Richtung nur wenig bekannt. Für das Pepsin hat E. Zunz¹⁾ gezeigt, dass es aus dem Eiweiss Stickstoff abspaltet, der mit Magnesia direkt destillirbar

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, 1899.

ist. Ebenfalls mit Magnesia austreibbaren Stickstoff fand schon vor längerer Zeit Hirschler¹⁾ bei der Trypsinverdauung von Fibrin, und Stadelmann²⁾ konnte zeigen, dass diese Abspaltung keine Fäulnisserscheinung ist.

III. Aus welchem Material stammt das in der Leber neu gebildete Ammoniak?

Bereits früher ist erwähnt worden, dass sich auch nach der Entfernung der leicht diffusiblen Substanzen durch Digestion bei Körpertemperatur noch eine Zunahme des Amidstickstoffes erzielen liess.

Da ebensowenig Zusätze von Leberglobulinlösungen wie von Extractivsubstanzen der Leber Ergebnisse lieferten, auch Versuche, das Material zur Ammoniakbildung zusammen mit dem Ferment auszusalzen, nicht zu Resultaten führten, so blieb nur übrig, zu untersuchen, wie sich vor und nach dem Aufenthalt des antiseptisch behandelten Leberbreies im Brutschrank die Stickstoffvertheilung in demselben gestaltet.

Zunächst gebe ich die Daten einer derartigen Versuchsreihe.

Versuchsprotokoll VII. Am 5. VI. 1899 wird die Leber eines eben getödteten Hundes fein zerhackt, von dem gleichmässigen Brei mehrere Proben von einigen Gramm Gewicht zur Gesamtstickstoffbestimmung entnommen, 100 g mit Toluolwasser bis zum 23. VI. in den Brutschrank gethan, 100 g mit stickstofffreiem Zinksulfat unter Hinzufügung von einigen Cubikcentimetern Schwefelsäure gesättigt, im Filtrat der Gesamtstickstoff bestimmt. Da Albumosen in der frischen Leber nicht vorkommen, so konnte die Differenz zwischen Gesamtstickstoff und dem Stickstoff des Zinksulfatfiltrates als Eiweissstickstoff angesehen werden.

Mehrere Proben des Filtrates wurden ferner mit concentrirter Salzsäure 8 Stunden auf dem Sandbade gekocht, dann wurde durch Destillation mit Magnesia der Amidstickstoff bestimmt. Indem ausserdem das Zinksulfatfiltrat direkt mit Magnesia destillirt und so der direkt austreibbare Stickstoff besonders bestimmt wurde, konnte durch Subtraction der durch Säure abspaltbare Amidstickstoff ermittelt werden.

Da es zu weitläufig sein würde, all die einzelnen, übrigens unter

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, 1886.

2) Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXIV, 1888.

einander gut stimmenden Kontrollanalysen wiederzugeben, so mögen nur die Resultate tabellarisch zusammengestellt werden.

Bemerkt sei noch, dass am Schluss des Versuches mit der digerirten Portion ebenso verfahren wurde. Etwa neu gebildete Albumosen würden hier in die gleiche Fraction wie das Eiweiss fallen, quantitativ ist das jedoch sicherlich unerheblich.

Beginn des Versuches 5. VI. 1899.

Eiweissstickstoff	89,78%
durch Säure abspaltbarer Amidstickstoff	1,86%
direkt austreibbarer Stickstoff	0,42%
Reststickstoff	9,47%
	<hr/>
	101,53%.

Schluss des Versuches 23. VI.

Eiweiss-(Albumosen-)Stickstoff	39,74%
durch Säure abspaltbarer Amidstickstoff	3,29%
direkt austreibbarer Stickstoff	8,39%
Reststickstoff	49,83%
	<hr/>
	101,25%.

Versuchsprotokoll VIII. In einem anderen Versuche wurde nur der Eiweiss- und der leicht austreibbare Amidstickstoff bestimmt, der Reststickstoff nur berechnet.

Beginn des Versuches 5. I. 1900.

Eiweissstickstoff	94,19%
direkt austreibbarer Amidstickstoff	1,13%
berechneter Reststickstoff	4,68%

Schluss des Versuches 19. I. 1900.

Eiweiss-(Albumosen-)Stickstoff	27,46%
direkt austreibbarer Amidstickstoff	5,63%
berechneter Reststickstoff	66,91%

Versuchsprotokoll IX. In einem dritten Versuche wurde ermittelt, dass am Beginn des Versuches am 17. V. 1899 in 100 g Leber 0,235 g mit Zinksulfat und Schwefelsäure nicht aussalzbarer Stickstoff vorhanden war, am 30. V. aber in 100 g Leber 1,656 g.

Bevor wir das Resultat dieser Versuche zusammenfassen, müssen wir bemerken, dass am Schluss der Versuche die Restfraction sicherlich auf eine ganze Reihe von stickstoffhaltigen Substanzen zu beziehen ist, dass aber neben Purinbasen und Diamidosäuren den grössten Antheil Amidosäuren darstellen. Auffallend ist — worauf später noch zurückgegriffen werden muss —, dass schon bei Beginn der Versuche die Restfraction nicht so ganz unbedeutend ist. Dieser Befund steht nämlich in einem gewissen Widerspruch dazu, dass in frischer Leber qualitativ keine Spur von Amidosäuren nach-

gewiesen werden konnte. Es ist daher im Auge zu behalten, dass in der frischen Leber diese Fraction im Wesentlichen aus anderen Substanzen bestehen dürfte.

Wie dem auch sei, das unmittelbare Resultat dieser Versuche lässt sich folgendermassen zusammenfassen: Die Eiweisssubstanzen nehmen während des Versuches beträchtlich ab, die Restfraction und der leicht austreibbare Stickstoff nimmt gleichzeitig nicht unerheblich zu. Dieser Parallelismus macht es wahrscheinlich, dass die Zunahme speciell des Amidstickstoffes auf Kosten von Eiweiss erfolgt. Doch kann zunächst auf Grund der gefundenen Werthe die Möglichkeit, dass der Ammoniakstickstoff aus dem Stickstoff der Restfraction hervorgeht, nicht ausgeschlossen werden.

Von physiologischen Gesichtspunkten aus ist es jedoch vor Allem wichtig, zu wissen: wird in der Leber Amidstickstoff aus Amidosäurenstickstoff gewissermassen durch eine Lockerung der NH_2 -Bindung gebildet, und in welchem Umfange? Das kommt für den Stoffwechsel in erster Linie in Betracht, während es in dieser Hinsicht minder wesentlich ist, ob es sich bei der Muttersubstanz um Amidosäuren oder um complexere Bruchstücke des Eiweissmoleküls handelt.

Um diese Frage zu entscheiden, wurde geprüft, ob im Lebersaft bei der Digestion der festgebundene, den Amidosäuren angehörige Stickstoff keine Veränderung erfährt. Zu dem Zwecke wurde vor und nach Beendigung der Digestion eine Bestimmung des durch Säure nicht abspaltbaren Stickstoffs vorgenommen. Die Eiweisskörper wurden, der Fragestellung dieser Versuche entsprechend, natürlich nicht entfernt.

Es ergab sich Folgendes:

Versuchsprotokoll X.

In dem Versuch betrug in % des Gesamtstickstoffs ausgedrückt:

	Am Beginn der Digestion	Am Schluss der Digestion
Der durch Säure abspaltbare Amidstickstoff	4,7 %	9,3 %
Der direkt austreibbare Amidstickstoff	4,9 %	6,2 %
Der gesammte Amidstickstoff . .	9,6 %	15,5 %

Versuchsprotokoll XI.

	Am Beginn der Digestion	Am Schluss der Digestion
Der durch Säure abspaltbare Amidstickstoff	8,7 %	6,3 %
Der direkt austreibbare Amidstickstoff	2,6 %	9,4 %
Der gesammte Amidstickstoff	11,3 %	15,7 %

Der gesammte Amidstickstoff hat also in beiden Versuchen deutlich zugenommen, es geht also fest gebundener Stickstoff in Amidstickstoff über. Dieses Resultat steht mit der Beobachtung Loewi's in Einklang, dass Glycocoll sich bei der Digestion mit Leberfermentlösung in einen Körper umwandelt, der leicht abspaltbaren Stickstoff aufweist.

IV. Beziehung der beschriebenen fermentativen Vorgänge zu Salkowski's Autodigestion.

Die im vorigen Kapitel wiedergegebenen Versuche haben gezeigt, dass zwischen der Abnahme der Eiweisskörper und der Abspaltung von Ammoniak in der Leber ein ausgesprochener zeitlicher Parallelismus besteht, und dass die Ammoniakbildung auch mit dem von Loewi studirten Process in Beziehung zu bringen ist. Indem ich zunächst auf eine weitere Prüfung der Frage, ob wir es hier mit einer einheitlichen Fermentwirkung zu thun haben, verzichtete, ging ich daran, zu untersuchen, ob diese Vorgänge mit der von Salkowski entdeckten und von ihm und seinen Schülern studirten Autodigestion in Zusammenhang stehen.

Die Arbeit Salkowski's, die anscheinend trotz ihrer grossen Bedeutung nicht hinreichende Beachtung in der Litteratur gefunden hat, bildete den Ausgangspunkt für unsere jetzt zu besprechenden Versuche.

Man gewinnt bei einem Ueberblick über die bei der Autodigestion gegebenen Vorgänge den Eindruck, dass wir hier eine fundamental wichtige Einrichtung des Organismus vor uns haben, eine Einrichtung, welche mit Hülfe fermentativer Umsetzung den Abbau des Zelleiweisses in den Organen in der Weise ermöglicht, dass aus geformtem Zellmaterial lös-

liches, aus nicht diffusiblen Bestandtheilen diffusible und daher leichter aus den Organen zu eliminirende Produkte gebildet werden.

Im Hinblick auf diese Auffassung möchte ich vorschlagen, Vorgänge dieser Art, die sich nicht nur bei postmortalen Digestion, sondern, wie ich Gelegenheit haben werde, zu zeigen, auch im lebenden Organismus vollziehen und beim normalen Abbau der Gewebe eine massgebende Rolle spielen dürften, als autolytische zu bezeichnen, wobei die Analogie mit anderen, zum Theil direkt hierher gehörigen Vorgängen, wie Karyolyse, Hämolysen u. s. w. deutlicher hervortritt als bei Verwendung der von Salkowski vorläufig gewählten Bezeichnung «Autodigestion», bei welcher man unwillkürlich hauptsächlich an die experimentelle Digestion extra corpus denkt.

Zunächst mögen in Kürze die einschlägigen Befunde von Salkowski, Schwiening und Biondi wiedergegeben werden.

Salkowski¹⁾ fand, dass mit Chloroformwasser digerirter Leberbrei Veränderungen der Art erleidet, dass organische und insbesondere auch stickstoffhaltige Substanz in Lösung geht. Da vor der Digestion gekochte Leber diese Erscheinung nicht zeigt, ist anzunehmen, dass es sich um eine Fermentwirkung handelt. Bei dieser Selbstverdauung der Leber sah Salkowski Leucin und Tyrosin auftreten. Ausserdem werden in der Arbeit ähnliche Beobachtungen über Hefe- und Muskelautodigestion, sowie über das Verhalten der Nucleine mitgetheilt, auf die in dieser Arbeit nicht eingegangen werden braucht.

Schwiening²⁾ stellte dann fest, dass mikroskopisch zellfreie Filtrate dieselben Veränderungen erleiden, wodurch die Enzymnatur des Vorgangs noch mehr sichergestellt wurde, ausserdem studirte Schwiening den Einfluss des Alkali auf die Autolyse.

Aus der Arbeit von Biondi,³⁾ der nach verschiedenen Richtungen die Arbeiten Salkowski's und Schwiening's

1) Zeitschr. f. klin. Med. 1891. Suppl.

2) Virchow's Archiv. 1894.

3) Virchow's Archiv. 1896.

weiterführte, sei hier nur Einiges hervorgehoben. Biondi zeigte, dass man ausser den Organen der von Salkowski benutzten Versuchsthiere (Hund und Kaninchen) auch jene anderer Thiere, z. B. Kalbsleber, zu den Experimenten über Autodigestion benutzen kann. Ferner konnte auch Autolyse nachgewiesen werden, wenn man an Stelle von Chloroform andere Antiseptica anwandte, so dass der Einwand, es handle sich um Chloroformwirkung, nicht erhoben werden kann. Endlich stellte Biondi vergleichende Untersuchungen über die Wirkung der Autodigestion der Leber und die Einwirkung von Trypsin auf Leber an und fand neben quantitativen Unterschieden, auf die er mit Recht wenig Werth legt, auch qualitative Verschiedenheiten. Als wesentlichsten Unterschied sieht er an, dass bei der Autodigestion in seinen Beobachtungen kein Tryptophan gebildet wurde, während Tryptophanbildung ein regelmässiger Befund bei der Pankreasverdauung ist.

So viel auch, wie ich weiter unten zeigen kann, für die Anschauung Salkowski's, die Biondi mit dieser Beobachtung gegen Neumeister stützen wollte, spricht, dass nämlich die Leberzellen ein eigenes, eiweiss-spaltendes Ferment bilden, so müssen wir doch unten Beobachtungen mittheilen, welche darthun, dass hier in Bezug auf die Bildung von Tryptophan auch nur quantitative resp. zeitliche Differenzen gegenüber dem Trypsin bestehen.

V. Ueber die bei der Autolyse der Leber auftretenden Produkte.

Wenn nun im Folgenden einige eigene Beobachtungen mitgetheilt werden sollen, so werde ich nicht über sämtliche in dieser Richtung angestellten Versuche ausführlich berichten, da Vieles — wenn auch mit anderen Methoden gewonnen — lediglich eine Bestätigung der Angaben Salkowski's und seiner Schüler brachte. Ich werde nur das herausgreifen, was als Ergänzung oder Weiterführung der bisherigen Kenntnisse angesehen werden kann.

Salkowski hat bereits hervorgehoben, dass anscheinend ausser Leucin und Tyrosin und den aus den Nucleinen stammenden Purinbasen bei der Autolyse noch andere

stickstoffhaltige Produkte gebildet werden. Dafür sprechen die quantitativen Versuche.

Albumosen werden — wenn überhaupt — sicher nur in geringer Quantität gebildet, wie ich mich in Bestätigung der früheren Angaben überzeugt habe. Auch scheinen sie nur ganz vorübergehend vorhanden zu sein, da sie in älteren Digestionsflüssigkeiten in mehreren Versuchsreihen ganz vermisst wurden.

Peptone wurden, wie von Salkowski etc., auch von mir nicht gefunden.

In Bezug auf die tiefer stehenden Produkte wäre es Aufgabe einer systematischen Untersuchung, nach all' den Substanzen zu fahnden, welche bei der Einwirkung anderer spaltender Agentien und namentlich der Verdauungsfermente aufgefunden worden sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten derartige Versuche nur im kleinsten Umfange angestellt werden.

Bereits ausführlich mitgeteilt sind die Beobachtungen über die Bildung von Ammoniak und Amidstickstoff bei der Autolyse (siehe voriges Kapitel). Hier konnte auch der quantitative Antheil festgestellt werden.

Ferner werden basische Produkte gebildet. Man erhält nach vollkommener Entfernung der Eiweisskörper, einschliesslich etwa gebildeter Albumosen, mit Phosphorwolframsäure sehr massige Niederschläge, in der frischen Leber nur geringfügige. Auch nach Entfernung des Ammoniaks mit Magnesia ist noch mit Phosphorwolframsäure fällbare Substanz nachweisbar. Ob es sich dabei nur um die Bildung von Purinkörpern handelt oder auch anderer Basen, bleibt noch zu untersuchen. Mit Benzoylchlorid und Aetznatron erhält man reichliche Massen eines bei alkalischer Reaction unlöslichen Niederschlages. Derselbe ist in Aethyl- und Methylalkohol und in Chloroform löslich, kann mit Wasser und mit Ligroin aus den Lösungen gefällt werden. Die Benzoylverbindung ist stickstoffhaltig, liefert bei der Kalischmelze kein Skatol und geht leicht in eine schmierige Masse über.

Von Amidosäuren wurde neben relativ grossen Quan-

titäten von Leucin und Tyrosin auch Glycocoll mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachgewiesen.

Versuchsprotokoll XII. Die Verdauungsflüssigkeit wurde zunächst durch Filtriren von den festen Bestandtheilen befreit, dann eingengt. Grosse Quantitäten Tyrosin werden durch Abfiltriren entfernt, dann wird das Filtrat mit Benzoylchlorid und Aetznatron tüchtig geschüttelt, die bei alkalischer Reaction ausfallenden Massen werden abfiltrirt, das Filtrat wird angesäuert und mehrfach mit Essigäther und Aether extrahirt. Mit Ligroin wird die Benzoesäure entfernt, wobei die nicht in das Ligroin übergehende Substanz deutlich ausgefällt wird. Endlich wird die ätherlösliche Fraction mit Benzaldehyd unter Hinzufügung von Natriumacetat und Essigsäureanhydrid nach den Angaben von Erlenmeyer jun.¹⁾ und Spiro²⁾ condensirt. Man erhält schöne, seidenglänzende Nadeln. Dieselben werden aus heissem Alkohol, in dem sie löslich sind, zwei Mal umkrystallisirt. Die Krystalle schmelzen bei 160°, während der Schmelzpunkt des Lactimids, das Erlenmeyer jun. als Condensationsprodukt aus Hippursäure und Benzaldehyd erhalten hat, bei 165—166° schmilzt. Weiteres Umkrystallisiren, das wohl den Schmelzpunkt in die Höhe gebracht hätte, wurde durch einen zufälligen Verlust des Materials verhindert.

Dieser Befund des charakteristischen Lactimids zeigt an, dass Hippursäure in der Lösung vorhanden war. Da von mir niemals Amidosäuren in der frischen Leber gefunden wurden, Hippursäure in der Rindsleber nicht nachgewiesen worden ist, auch Glycocholsäure, falls Spuren vorhanden sein sollten, durch das angewandte Verfahren nicht würde gespalten werden, so ist es das Naheliegendste, das gefundene Glycocoll als autolytisches Produkt der Leber aufzufassen.

Das Vorkommen von Glycocoll unter den Digestionsprodukten der Leber dürfte physiologisches Interesse haben. Seitdem Spiro gezeigt hat, dass Glycocoll ein Spaltungsprodukt einer grösseren Anzahl von Eiweisskörpern ist, erscheint es nicht überraschend, wenn bei der Autolyse der Leber neben Leucin und Tyrosin auch Glycocoll auftritt. Da ferner die Glycocholsäure in der Leber des lebenden Thieres gebildet wird, liegt die Vermuthung nahe, dass auch das an Cholsäure gebundene Glycocoll ein Produkt des autolytischen Processes ist.

Ferner ist es namentlich nach den Untersuchungen von Wiener³⁾

1) Berichte der chem. Gesellsch. Bd. 25 — 30.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXVIII, 1899.

3) Arch. f. exper. Pathol., Bd. XXXX u. XXXXII, 1898 u. 1899.

und Weiss¹⁾ wahrscheinlich, dass Glycocoll aus Harnsäure, und Harnsäure aus Glycocoll im Organismus gebildet werden kann; da nun ebenfalls nach Wiener in der Rindsleber eine gleichzeitige Entstehung und Zerstörung von Harnsäure angenommen werden darf, so ist es möglich, dass Glycocoll in der Leber Vorstufe wie Abkömmling der Harnsäure ist.

Schliesslich sei noch daran erinnert, dass Loewi das Glycocoll durch das Richet'sche Leberferment in einen äther-alkohollöslichen, stickstoffhaltigen Körper überführen konnte, und dass Glycocoll sehr vollkommen im Organismus in Harnstoff umgewandelt wird.

Bei mehreren Versuchen sah ich als einen Hinweis auf ein weiteres Produkt während der Autolyse die Tryptophanreaction auftreten. Während die frische Leber mit Bromwasser keine Reaction gab, erhielt man nach ca. 14 tägiger Selbstverdauung mit Bromwasser eine starke Violettfärbung. In anderen Fällen wurde keine Bromreaction beobachtet. Auch Biondi hat sie nur dann gefunden, wenn sie schon in der frischen Leber vorhanden war. Wahrscheinlich tritt sie erst spät und auch dann nur vorübergehend auf. Ihr Fehlen kann jedenfalls nicht als Unterscheidungsmerkmal der Leberautolyse gegenüber der Trypsinwirkung gedeutet werden.

Soweit es gestattet ist, die mit Leberauszügen erhaltenen proteolytischen Vorgänge mit Trypsinwirkung zu vergleichen, so ergeben sich als unterscheidende Momente:

1. Der Verlauf der autolytischen Spaltung ist ein langsamer, trotzdem tritt die Bildung von Albumosen dabei zurück, während die Bildung von Endprodukten überwiegt.
2. Dabei erfolgt eine Ueberführung von fest gebundenem Stickstoff in locker gebundenen, was bei der Trypsinverdauung nicht der Fall oder wenigstens bisher nicht bemerkt ist.
3. Das proteolytische Ferment der Leber wirkt auslesend, nicht auf alle, sondern nur auf bestimmte Eiweissstoffe ein (s. nächstes Kapitel).

Das Bestehen dieser Differenzen würde ganz gut damit im Einklang stehen, dass beiden Fermenten im Organismus

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, 1898.

auch verschiedene Functionen zufallen (dem Trypsin Vorbereitung der Nahrungsstoffe für die Resorption und Assimilation, der Autolyse der Abbau des Organeiweisses und Vorbereitung zur Harnstoffbildung). Man darf jedoch auch nicht ausser Acht lassen, dass im Leberauszug mehrere Fermente vorhanden sind, und dass möglicher Weise die beobachteten Wirkungen erst durch ihr Zusammenwirken zu Stande kommen, wobei dann eine Uebereinstimmung mit der isolirten Trypsinwirkung nicht zu erwarten ist.

Vorläufig ist jedenfalls die Identität des Trypsins und des Ferments der Leberautolyse nicht bewiesen, und es liegt kein ausreichender Grund vor, eine derartige Identificirung vorzunehmen.

Anhangsweise seien einige ursprünglich aus anderen Gründen ausgeführte Versuche über Autolyse der Vogelleber erwähnt.

Chassevant und Richet haben in der Annahme, dass a priori ein «ferment uropoïétique» in der Vogelleber nicht zu erwarten wäre, geprüft, ob die Vogelleber ein harnstoffbildendes Ferment besitzt. Sie verneinen es, da sie keine Abnahme zugesetzter Harnsäure feststellen konnten.¹⁾ (Compt. rend. de la société de biol., 1898, Nr. 32.)

Ich habe gefunden, dass die Gänseleber bei der Autolyse Leucin und Tyrosin und daneben basische Produkte liefert, deren Natur aus Mangel an Material nicht ermittelt werden konnte.

VI. Welche Eiweissstoffe unterliegen der autolytischen Spaltung?

Da die gefundenen Produkte der Autolyse sich als Spaltungsprodukte von Proteinstoffen herausstellen, so ist zunächst die Frage zu prüfen, welche Eiweisskörper der Leber durch das autolytische Ferment vorzugsweise angegriffen werden.

Zu diesem Zwecke habe ich nachstehenden Versuch ausgeführt:

Versuchs-Protokoll XIII. Eine grössere Quantität Leberbrei wird mehrere Monate mit Toluolwasser bei Brutschranktemperatur sich selbst überlassen.¹⁾ Nach einigen Wochen wird der ungelöste Rückstand durch Filtriren entfernt, wiederum nach einer Woche die Hauptmasse der diffusiblen Produkte durch Dialyse gegen fliessendes Wasser beseitigt

¹⁾ Es mag hier übrigens auf ein Missverständniss der Autoren hingewiesen werden. Sie schreiben, Loewi habe das Vorkommen eines harnstoffbildenden Ferments in der Leber der Säuger bestätigt; es ist dafür zu setzen: «nicht bestätigt».

und die Verdauung im Brutschrank fortgesetzt, nachdem durch Kochsalzzusatz ein Salzgehalt von etwa 1% hergestellt war. Während der Dialyse bildet sich in der Flüssigkeit ein Niederschlag, der auch nicht nach dem Kochsalzzusatz verschwindet, sondern bei der fortgesetzten Digestion noch zunimmt. Schliesslich wird nach drei Monaten festgestellt, dass die Eiweisspaltung ihren Abschluss gefunden hat.

Sodann wird der Niederschlag durch Filtriren von der Lösung getrennt. Er ist von dunkler Farbe, in Wasser ganz unlöslich. Derselbe wird mit viel Wasser gewaschen; er ist in der Kälte weder in Natronlauge, noch in Essigsäure, auch bei starker Concentration der Lösungsmittel löslich. Beim Kochen mit Natronlauge löst sich der Niederschlag, kann dann mit Essigsäure wieder ausgefällt werden und ist nunmehr im Ueberschuss von Essigsäure löslich. Beim Kochen mit Essigsäure bleibt er ungelöst.

Die Substanz enthält eine nicht unbeträchtliche Menge Phosphor. Die Xanthoproteinreaction ist deutlich positiv.

Die Molisch'sche Probe, die Reaction von Tollens mit Phloroglucin und Salzsäure und die Millon'sche Reaction fallen negativ aus.

Mit Pepsinsalzsäure wird eine Probe in 24 Stunden bis auf einen geringen Rest verdaut. Der Rest sowohl, wie auch die in Lösung gegangene Portion ist phosphorhaltig.

Neben diesem unlöslichen Körper, der wahrscheinlich ein Gemisch von Nucleinen mit einem Globulin und vielleicht noch mehr Substanzen darstellt, findet sich in der Lösung ein coagulabler Eiweisskörper. Derselbe wird durch Ammonsulfat erst bei einer Sättigung von über 60% ausgesalzen, die Coagulation durch Hitze beginnt bei 75°, während bei 80° deutlich Flocken gebildet werden. Der mehrfach durch Aussalzung und wiederholtes Lösen gereinigte Körper gibt eine deutliche Reaction mit Millon's Reagens, eine schwache Xanthoproteinreaction, keine Spur von Reaction mit α -Naphtol und Schwefelsäure. Der lösliche Eiweisskörper zeigt somit im Ganzen das Verhalten eines Albumins.

Albumosen werden nicht gefunden.

Das Auffallendste dieses Resultates dürfte sein, dass sich keine Spur von Globulin mehr in der Lösung befand, während sich in einem nicht verdauten Leberauszug, auch nach starker Dialyse und auch ohne neuen Salzzusatz, immer noch reichlich ein Eiweisskörper nachweisen lässt, der sich in Bezug auf Aussalzbarkeit wie ein Globulin verhält.

VII. Versuche zur Isolirung des bei der Autolyse wirksamen proteolytischen Fermentes.

Wenn wir die Wirkungen der Autolyse ins Auge fassen, so sehen wir durch die Spaltung von Eiweiss, daneben Bil-

dung von Amidosäuren und Ammoniak erfolgen. Sicherlich sind diese Leistungen von physiologischem Interesse, da der beim Absterben von Zellindividuen oder Zelltheilen in der Norm erfolgende Abbau der Eiweisskörper und die Bildung wichtiger intermediärer Produkte auf die Wirkung von Organfermenten zurückgeführt erscheint. Genauere Studien über die Wirkungen der dabei thätigen Fermente werden aber erst möglich sein, wenn ihre Isolirung einigermaßen gelungen sein wird.

Im Folgenden soll über solche Isolirungsversuche berichtet werden.

Nach Analogie anderer Fermente war anzunehmen, dass das autolytische Leberferment aussalzbar sein würde.

Die Leber wurde daher zunächst mit Toluolwasser der Autolyse überlassen. Hierbei gingen, wie in den früher wiedergegebenen Versuchen, grosse Quantitäten aussalzbarer Substanzen in nicht aussalzbare über, und man befreite so das Ferment von vorne herein von grossen Massen anhaftender Substanz.

In der That wurde dann erst oberhalb einer 60%igen Sättigung mit Ammonsulfat¹⁾ in dem 14 Tage digerirten Leberauszug ein Niederschlag erhalten. Nachdem Salz bis zur Sättigung zugefügt worden war, setzte sich allmählich ein reichlicher Niederschlag ab, der nach dem Abfiltriren in Wasser gelöst wurde.

Diese Lösung war klar und wirkte deutlich verdauend auf Leberbrei.

Versuchsprotokoll XIV. Von der Lösung werden 2 Portionen à 50 ccm., von denen die eine vorher gekocht wird, mit je 100 g frischer Hundeleber und 30 ccm. Wasser und einer reichlichen Quantität Toluol zusammengebracht und 16 Stunden bei Brutschranktemperatur gehalten. Dann wird in beiden Kontrollversuchen sorgfältig enteiweisst und in den Filtraten der nicht coagulable Stickstoff bestimmt.

Leber +	gekochtes	Ferment	ergab	0,688	nicht	coagulablen	Stickstoff
„	+	ungekochtes	„	1,124	„	„	„

¹⁾ In Uebereinstimmung mit den im vorigen Kapitel mitgetheilten Versuchen über die Betheiligung der einzelnen Lebereiweisskörper an der Autolyse.

Versuchsprotokoll XV. Die Leber eines eben getödteten Hundes wird zerhackt. Der Brei wird mit 25 ccm. $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure durchmischt und 2 Stunden so belassen. Dann neutralisirt man die Säure durch eine entsprechende Quantität Normalnatronlauge und wägt von dem so behandelten Brei zwei Portionen à 200 g ab. Zu beiden werden je 50 ccm. Fermentlösung (wiederum die eine Probe vorher gekocht) hinzugehan und nun wird wie im vorigen Versuche verfahren mit dem Unterschiede, dass der Aufenthalt im Brutschrank auf 3 Tage ausgedehnt wird.

Es wurde nicht coagulabler Stickstoff gefunden:

Leber +	gekochtes Ferment	2,542 g
» +	ungekochtes »	3,604 »

Bei vollkommener Sättigung mit Ammonsulfat wird also ein Ferment ausgezallen, das deutlich auf Leberbrei verdauend einwirkt. Bei 80% Sättigung mit Ammonsulfat wurde in einem anderen Versuche nichts erhalten. Das Ferment scheint also erst bei vollständiger Sättigung mit Ammonsulfat ausgesalzen zu werden.

Diese Feststellung beansprucht von verschiedenen Gesichtspunkten aus Interesse. Zunächst wird es nunmehr nicht unmöglich sein, in der Isolirung des Fermentes weiter zu kommen. Ferner ist hervorzuheben, dass dieses Verhalten durchaus mit dem Verhalten des in der Wirkung so ähnlichen Pankreastrypsins übereinstimmt. Endlich ermöglicht uns das Aussalzungsverfahren eine scharfe Trennung dieses Lebertrypsins von der Aldehydase der Leber, was für physiologische Versuche von Wichtigkeit ist.

Zu dem letzten Punkte sei hier gleich bemerkt, worauf in einer folgenden Mittheilung in anderem Zusammenhange noch wird eingegangen werden, dass die Aldehydase durch Autolyse nicht zerstört wird; in Leberauszügen, welche längere Zeit digerirt waren, wurde sie noch deutlich wirksam angetroffen.

VIII. Wirkung der durch Autolyse erhaltenen Lösungen auf Hippursäure, Harnstoff und Blutgerinnung.

Neben der Isolirung des Fermentes ist es für ein specielleres Studium der proteolytischen Leberfunction nöthig, möglichst einfach constituirte Substanzen aufzufinden, welche von Leberauszügen hydrolytisch gespalten werden und event. als Reagentien zum Nachweis autolytischer Fermente dienen

könnten. Es wurden Versuche mit Hippursäure und Harnstoff angestellt, die hier ihre Stelle finden sollen, weil die Leber-extracte aus ihnen Produkte abspalten (Glycocoll resp. Ammoniak), die wir als Produkte der Autolyse kennen gelernt haben. Natürlich können wir vorläufig nur aussagen, dass Leberauszüge diese Substanzen spalten — ob das eine Leistung des proteolytischen Fermentes darstellt, muss zunächst unentschieden bleiben.

Versuchsprotokoll XVI. Rindslebersaft, der bereits mehrere Wochen unter Toluolzusatz der Selbstverdauung ausgesetzt war, wird mit einem Tropfen dünner Sodalösung schwach alkalisch gemacht, dann mit benzoessäurefreier Hippursäure versetzt. Nach viertägigem Aufenthalt im Brutschrank wird durch Ausschüttelung mit Ligroin Benzoessäure aus der Lösung isolirt, deren Schmelzpunkt bei $119,5^{\circ}$ liegt, während reine Benzoessäure bei 121° schmilzt.

Versuchsprotokoll XVII. In einem zweiten gleich angestellten Versuche wird ebenfalls Benzoessäure gefunden.

Schmiedeberg¹⁾ hat bereits vor längerer Zeit gefunden, dass die Leber Hippursäure spaltet, indem er sein Hippursäure spaltendes «Histozym» unter Cautelen, die Fäulnisseinwirkungen unwahrscheinlich machten, in der Leber nachwies. — Minkowski²⁾ fand das Schmiedeberg'sche Histozym nicht in der Leber.

Nach Nencki³⁾ wird vom Pankreas Hippursäure gespalten, Gulewitsch⁴⁾ beobachtete bei Versuchen mit Trypsin, das völlig vom fettspaltenden Pankreasferment befreit war, keine Hippursäurespaltung. — Da auch für die Leber eine lipolytische Function nachgewiesen ist, so muss die Frage, welches Ferment der Leber bei der Hippursäurespaltung betheiligt ist, noch genauer untersucht werden.

Die Spaltung von Harnstoff durch Lebersaft unter Bildung von Ammoniak lehrt folgender Versuch.

Versuchsprotokoll XVIII. Rindslebersaft, der einige Zeit mit Toluol aufgehoben war, wird in Portionen von je 40 ccm. getheilt. Sodann werden folgende Kontrolllösungen hergestellt :

1) Arch. f. exper. Path., Bd. XIV, 1881.

2) Arch. f. exper. Path., Bd. XVII, 1883.

3) Arch. f. exper. Path., Bd. XX, 1886 (nach Versuchen von Blank).

4) Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII. 1899.

- | | | | |
|----------|---------------------------|---|--------|
| 1. u. 2. | 40 ccm. Leberauszug | } | Toluol |
| | 40 „ Aq. dest. | | |
| 3. u. 4. | 40 „ Leberauszug | } | Toluol |
| | 40 „ reiner Harnstofflös. | | |
| 5. | 20 „ derHarnstofflös. | } | Toluol |
| | 40 „ Aq. dest. | | |
| 6. | 40 „ derHarnstofflös. | } | Toluol |
| | 40 „ Aq. dest. | | |

Die Kölbchen mit den Lösungen werden 36 Stunden bei Brutschranktemperatur gehalten. Danach kommen alle Proben auf 5 Tage in Schlösing'sche Apparate.

Es wird Ammoniak-Stickstoff gefunden:

- I. Leberauszug allein: 0,0044 g
- II. Leberauszug + 40 ccm. Harnstofflösung 0,0097 g
- III. 40 ccm. Harnstofflösung 0,0002 g.

Der Lebersaft hat also aus Harnstoff 0,0051 g Ammoniak-Stickstoff gebildet.¹⁾

Auf dieses Resultat komme ich in einer späteren Mittheilung über die Harnstoffbildung in der Leber noch zurück; hier soll nur betont werden, dass wir danach im Harnstoff einen Körper besitzen, den wir gleichsam als Indicator bei weiteren Versuchen über Autolyse der Leber benutzen können.

Die Beziehungen, welche in neuerer Zeit zwischen der gerinnungshemmenden Wirkung der Albumosen und der Leberfunction²⁾ gefunden worden sind, veranlassten mich, den Einfluss der autolytischen Auszüge auf die Blutgerinnung zu untersuchen.

Injicirte ich nicht zu kleine Quantitäten durch Autolyse erhaltenen, proteolytisch wirksamen Lebersaftes in die Vena femoralis eines Hundes, so veränderte sich durchaus nicht

1) Anm. bei der Correctur: Ein Versuch, bei dem die Ammoniakbestimmungen nach der Methode von Nencki-Zaleski ausgeführt wurden, bestätigte dieses Resultat; er zeigte, dass gekochter Lebersaft Harnstoff nicht spaltet und ergab endlich, dass 17,4% des Harnstoff-Stickstoffs in Ammoniakstickstoff übergeführt wurden.

2) Litteratur s. bei Spiro u. Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, 1897, welche wohl am einwandfreiesten bewiesen haben, dass Witte-Pepton nicht direkt das Blut ungerinnbar macht, sondern erst nach Passage der Leber. — Eine sehr vollständige Litteraturübersicht gibt auch Arthus, La coagulation du sang.

die Blutgerinnbarkeit, während das Thier auf Einspritzung von Witte-Pepton prompt reagirte.

Positive Resultate gaben dagegen Versuche, bei denen direkte Mischung von Lebersaft mit Blut vorgenommen wurde.

Versuchsprotokoll XIX. Lebersaft, der durch 36stündige Dialyse gegen fließendes Wasser von der Hauptmasse der diffusiblen Produkte befreit und nachher auf 1%igen Kochsalzgehalt gebracht war, wird mit Blut eines normalen Hundes zusammengebracht. Das Gemisch gerinnt sofort. Nach etwa $\frac{1}{4}$ Stunde aber beginnt sich das Gerinnsel bereits zu lösen, und diese «Fibrinolyse» schreitet allmählich immer weiter.

Versuchsprotokoll XX. Ein anderer Lebersaft, aus dem die Produkte der Autolyse nicht durch Dialyse entfernt waren, verhindert etwa $\frac{1}{4}$ Stunde die Gerinnung zugesetzten Hundeblutes schon in kleineren Quantitäten. Dann tritt Gerinnung ohne nachträgliche Fibrinolyse ein. Derselbe Lebersaft, nur vorher gekocht, verhält sich ebenso.

Ich verzichte auf eine Discussion dieser vereinzelter Befunde, die eine Fortsetzung der Versuche wünschenswerth erscheinen lassen.

IX. Findet die autolytische Spaltung auch im lebenden Gewebe statt?

Schliesslich wurde geprüft, ob sich Bedingungen schaffen lassen, unter denen man bereits intra vitam die Autolyse der Leber beobachten könnte.

Die Versuche wurden nach zwei Methoden ausgeführt.¹⁾

Hunden wurde die Arteria hepatica und die Vena portae unterbunden, nach einigen Stunden die Ligatur gelöst. Ein Thier²⁾ überlebte die Operation eine Anzahl Stunden, und in seiner Leber fand sich Leucin und Tyrosin.

Bei anderen Hunden wurde ein Theil der Leber dauernd unterbunden. Diese Thiere lebten etwas länger. Auch hier konnte bei einem Hunde, der 36 Stunden die Operation überlebt hatte, im abgebundenen Lappen Leucin und Tyrosin nachgewiesen werden, in den normalen Theilen der Leber nicht.

Da ich aber zur Zeit noch von keinem Hund, der die

¹⁾ Dieselbe Frage wurde auch mit Hülfe der Phosphorvergiftung studirt. — Ueber diese Versuche berichte ich in der folgenden Mittheilung.

²⁾ Die meisten Thiere starben bei der Lösung der Ligatur.

Operation lange genug überlebt hat, und bei dem ein hinreichend grosser Leberlappen abgebunden war, eine bakteriologische Untersuchung mit negativem Befund besitze, so müsste man, trotzdem immer nur im abgebundenen Gewebe die Produkte gefunden wurden, während bei den bakterienhaltigen Organen die Bakterien stets auch im normalen Gewebe gefunden wurden,¹⁾ die Frage noch als unerledigt ansehen.

Nun habe ich aber ausserdem nach der Methode, die ursprünglich Meissner angegeben hat und mit der später Hauser und Fr. Kraus gearbeitet haben, einen Versuch mit völlig aseptischen Leberstücken ausgeführt, der zu einem unzweideutigen, positiven Resultat führte.

Diesen Versuch werde ich daher etwas genauer schildern.

Versuchsprotokoll XXI. Unter ähnlichen Cautelen, wie Kraus²⁾ sie angewandt und beschrieben hat, werden einem Hunde, der vorher mit Chloroform getödtet wird, Leberstücke von ca. 20 g entnommen und möglichst schnell in vorher sterilisirte, mit Wattebausch verschlossene Glasgefässe gebracht. So werden sie bei Brutschranktemperatur längere Zeit belassen. Bereits am nächsten Morgen sind auffallende Erscheinungen zu constatiren. Die Farbe der Leber ist bereits verändert, die Röhrchen lassen einen eigenthümlichen Geruch, ähnlich dem von zersetztem Eiweiss, erkennen, und die Leberstücke sind von schaumiger Flüssigkeit bedeckt. Diese Erscheinungen haben so viel Aehnlichkeit mit den Vorgängen bei der Fäulniss, dass ein früherer Versuch in diesem Stadium ohne weitere Untersuchung verworfen wurde.

48 Stunden nach Beginn des Versuches wird von der Leber auf Bouillon und Agar übergeimpft, ausserdem zur Prüfung auf etwa anwesende Anaëroben eine Stichcultur in das Innere eines Nährbodens angelegt. Alle Nährböden bleiben dauernd steril.³⁾

72 Stunden nach der Leberentnahme wird sodann auch mikroskopisch die absolute Sterilität festgestellt.

1) Die Thiere hatten in diesen Fällen immer einige Stunden nach dem Tode gelegen.

2) Arch. f. exper. Pathol., Bd. XXII, 1886.

3) Die sämmtlichen bakteriologischen Untersuchungen wurden von den Herren Dr. Bruns und Dr. Conradi, Assistenten am Hygienischen Institut, ausgeführt; ich möchte auch an dieser Stelle ihnen für die grosse Freundlichkeit besten Dank sagen. Ganz besonderen Dank schulde ich meinem Freunde, Herrn Dr. Ernst Fuld, der mir mit unermüdlicher Bereitwilligkeit bei den zeitraubenden Therversuchen half.

Im Präparate sieht man nur gelbe Klumpen, die wie zerfallenes Lebergewebe aussehen. Bis zum nächsten Tage krystallisiren unter dem Deckglase eine grosse Zahl von typischen Tyrosinbüscheln aus.

Tyrosin wird aber noch deutlicher durch Verarbeitung des ganzen Inhaltes des Röhrchens nachgewiesen. Das Leberstück wird mit wenig destillirtem Wasser gekocht, dann wird filtrirt, das Filtrat eingengt, der syrupöse Rückstand mit schwachem Alkohol heiss extrahirt.¹⁾ Der Alkohol wird dann wieder eingedunstet und der Rückstand über Nacht stehen gelassen. Derselbe zeigt mikroskopisch wiederum typisches Tyrosin und gibt eine sehr intensive Millon'sche Reaction.

Das Resultat dieses Versuches lässt sich in mehrfacher Weise präcis formuliren.

Während Kraus in entsprechend angeordneten Versuchen durch quantitative Bestimmungen den Nachweis führen konnte, dass eine Fettzunahme²⁾ nicht statthat, ist die Entstehung von Tyrosin in aseptischer Leber durch unseren Versuch erwiesen.

Das ist aber nicht anders möglich, als wenn Eiweisskörper in der «überlebenden» Leber gespalten werden. Damit ist gezeigt, dass die Autolyse nicht nur in Lösungen und unter Zusatz von Antisepticis zu Stande kommt, sondern auch im Lebergewebe, das lediglich aus dem Gesamtorganismus ausgeschaltet ist. So wird es noch wahrscheinlicher, dass wir einen normalen Vorgang, eine physiologische Function der Leberzellen vor uns haben.

Ferner macht der Versuch den Einwand hinfällig, bei unseren antiseptischen Autolyseversuchen könnten wir durch Bakterienwirkungen getäuscht worden sein. Die Möglichkeit eines derartigen Einwandes ist heute dadurch näher gerückt, dass auch proteolytische Enzyme der Bakterien mehrfach gefunden worden sind. Dieser Einwand muss aber fallen gelassen werden, da eben die Autolyse auch bei vollkommen durchgeführter Asepsis zu beobachten ist. Man kann nun auch nicht mehr annehmen, im Lebersaft könne ja Autolyse stattfinden, aber in der histologisch unveränderten Leber seien

1) So haben wir stets am leichtesten das Tyrosin aus der Leber einigermaassen isolirt.

2) Eine Fettbildung wäre immer noch möglich, da sie durch parallel verlaufende Fettzerstörung verdeckt sein könnte.

vielleicht Substanzen vorhanden, welche diese Wirkung nicht aufkommen liessen.

Es wäre ferner verfehlt, diesen Eiweisszerfall als eine Absterbeerscheinung der Zellen aufzufassen. Das autolytische Ferment wird durch das Aufhören der Circulation nicht zerstört, und der Unterschied gegenüber dem intravitalen Zustand besteht für die Autolyse nur darin, dass jetzt das Material nicht ersetzt wird und die Produkte nicht fortgeschafft werden.

Das sind aber zum Theil sicher dieselben Bedingungen, wie sie bei der aseptischen Nekrose im Sinne der pathologischen Anatomie und bei den embolischen Infarcten gegeben sind. Die proteolytischen Enzyme leiden durch diese pathologischen Ereignisse an sich nicht und können die Rückbildung des ausser Function gesetzten Gewebes besorgen.

In dieser Arbeit haben wir also Anhaltspunkte dafür erhalten, dass die Autolyse der Leber geeignet ist, wichtige Leistungen des intermediären Stoffwechsels zu erklären. Auf die mehrfach gestreifte Beziehung zur Frage der Harnstoffbildung soll noch in einer besonderen Mittheilung eingegangen werden. Wir haben aber ferner gesehen, dass die intracellulären Fermente verdienen, auch zur Erklärung pathologischer Verhältnisse herangezogen zu werden. In einer sich dieser Arbeit unmittelbar anschliessenden Mittheilung wird über Versuche berichtet werden, die sich auf das Verhalten der Autolyse bei der Phosphorvergiftung beziehen.

Ueber die Beziehungen der Leber- und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse.¹⁾

Von

Dr. Martin Jacoby aus Berlin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 35.)

(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

In der vorangehenden Arbeit habe ich im Anschluss an Untersuchungen über Leberfermente die experimentell begründete Anschauung ausgesprochen, dass speciell auch die autolytische Fermentwirkung der Leber, wie sie Salkowski entdeckt hat, und die in der betreffenden Arbeit weiter verfolgt wurde, eine normale Function der Leberzellen darstellt. Die Versuche über das Verhalten der Leber bei Phosphorvergiftung, über die in dieser Arbeit berichtet werden soll, wurden ursprünglich lediglich in der Absicht unternommen, weitere Stützen für diese Annahme zu gewinnen.

Salkowski hat bereits darauf aufmerksam gemacht, dass bei der Autodigestion der Leber dieselben Produkte gebildet werden (Leucin und Tyrosin), wie man sie in der Leber, im Blut und im Harn bei der acuten gelben Leberatrophie kennen gelernt hat.

Einen derartigen Befund wird man so deuten dürfen, dass sich bei der acuten Leberatrophie ein Vorgang in der Leber vollzieht, welcher mit dem bei der Autolyse nachgewiesenen identisch ist oder ihm mindestens sehr nahe steht. Der gleiche Schluss liegt betreffs des Vorgangs bei der Phosphorvergiftung auf der Hand.

1) Ausgeführt mit Unterstützung der Gräfin Bose-Stiftung.

Von dem Vorkommen von Leucin und Tyrosin in der erkrankten Leber musste man sich jedoch zunächst durch eigene Versuche überzeugen, da viele bereits vorliegende positive Befunde von Leucin und Tyrosin in der Leber ohne Rücksicht auf bakterielle Einwirkungen, sicherlich die meisten, wenn nicht alle, ohne Kenntniss der Autolyse erhoben worden sind und Irrthümer daher wohl möglich waren. Auch ist a priori eigentlich zu erwarten, dass man selbst bei massenhafter Bildung von Leucin und Tyrosin in der Leber nichts davon findet, weil diese diffusiblen Stoffe mit Leichtigkeit vom Blut fortgeschafft werden.

Ich habe nun bei mit Phosphor vergifteten Hunden mehrfach Leucin und Tyrosin in der Leber gefunden; in diesen Fällen wurde die Leber der Thiere in der Agonie entnommen. Zwei Hunde, die früher getödtet wurden, boten zwar bereits das typische anatomische Bild der Phosphorleber dar, aber man konnte kein Leucin und Tyrosin nachweisen. Es ist wahrscheinlich, dass, so lange noch eine ungestörte Circulation besteht, die Amidosäuren aus der Leber herausgeschafft werden. In normaler frischer Hunde- oder Rindsleber wurden niemals, auch wenn grosse Quantitäten verarbeitet wurden, Leucin und Tyrosin oder überhaupt Amidosäuren gefunden.

Daneben wurde in den Lebern von Phosphorhunden die Stickstoffvertheilung untersucht, wie es in der vorigen Arbeit für normale Verhältnisse beschrieben worden ist. Dabei ergab sich, dass der Amidstickstoff und zwar namentlich der direkt als Ammoniak mit Magnesia austreibbare gegen die Norm stark vermehrt ist. Das äussert sich am deutlichsten, wenn man die Organe der Selbstverdauung überlässt.

Im Folgenden stelle ich unter Fortlassung der übrigen Werthe eine Anzahl Daten für den direkt austreibbaren Stickstoff zusammen. Die betreffenden Versuche sind alle unter gleichen Bedingungen angestellt. Die Dauer der Autolyse beträgt stets 14 Tage.

Direkt austreibbarer Stickstoff in Procenten des Gesamtstickstoffs:

A.

	Vor der Autolyse	Nach der Autolyse	Zunahme
1. Normaler Hund	0,42 %	8,39 %	7,97 %
2. „ „	1,13 %	5,63 %	4,50 %

B.

	Vor der Autolyse	Nach der Autolyse	Zunahme
1. Tod 36 Stunden nach Phosphorvergiftung. Keine typische Leber	0,56 %	13,06 %	12,50 %
2. Typische Phosphorleber	1,7 %	29,9 %	28,2 %
3. „ „	9,53 %	38,33 %	28,8 %

Diese Befunde zeigen, dass die Phosphorleber schon im lebenden Thier eine Veränderung erfährt (Auftreten von Leucin und Tyrosin, Vermehrung des leicht austreibbaren Stickstoffs), wie sie einem autolytischen Process entspricht. Die Vermuthung, dass es sich um einen sehr ähnlichen, wenn nicht identischen Vorgang handelt, findet eine Stütze darin, dass die Phosphorlebern bei der Autolyse, wie die eben angeführten Versuche zeigen, eine besonders starke autolytische Ammoniakbildung aufweisen.

Ueberdies wurde bei diesen Versuchen ein sehr eigen-
thümliches Verhalten direkt beobachtet. Wenn man 100 g normale, gehackte Hundeleber mit einigen 100 ccm. Toluol-
wasser zusammen im Brutschrank stehen lässt, so geht zwar allmählich Lebersubstanz in Lösung, aber es bleibt doch, wenigstens für längere Zeit, der grösste Theil des Organbreies ungelöst. Verfährt man ebenso mit Phosphorleber, so kann man bereits in etwa 12 Stunden, spätestens in 24 Stunden bemerken, dass die Hauptmasse der Leber in Lösung gegangen ist und nur ein unbedeutender Bodensatz zurückbleibt.

Diese Erscheinung, die auffälliger ist, als ich es schildern kann, lässt sich nicht gut zahlenmässig durch Vergleich der verdauten Eiweissmengen in normaler und in Phosphorleber wiedergeben; anscheinend spielen da noch andere Dinge mit.

Es wurde geprüft, wieviel Eiweiss in der normalen Leber und gleichzeitig in einer Phosphorleber während 24 Stunden verdaut wird, weil für einen so kurzen Zeitraum der makroskopische Unterschied am auffallendsten war.

Es betrug der Eiweissstickstoff in Procenten des Gesamtstickstoffs:

	Vor der Autolyse	Nach der Autolyse	Abnahme	Abnahme in Proc. des Eiweiss- stickstoffs
Phosphorleber	81,5 %	59,3 %	22,2 %	27,2 %
Normal	89,7 %	71,8 %	17,9 %	20,0 %

Da die vorstehenden Versuche eine Steigerung der proteolytischen Vorgänge in der Phosphorleber sichergestellt haben, die eventuell auf eine Vermehrung des betreffenden Fermentes bezogen werden könnte, wurde zunächst geprüft, ob im Uebrigen die fermentativen Vorgänge in der Leber nachweisbar verändert sind.

Weil die Lösungen bei der Autolyse sich dunkel färben, wurde untersucht, ob vielleicht eine «Tyrosinase» vorhanden ist, ein Ferment, das ja Tyrosin in einen missfarbigen dunklen Körper überführt. Jedoch wurde eine Veränderung dieser Art an zugesetztem Tyrosin weder unter dem Einfluss der normalen, noch der Phosphorleber beobachtet.

In Betreff der Aldehydase wurde festgestellt, dass sie der Phosphorleber nicht fehlt.

Ferner wurde untersucht, ob die Anwesenheit von kleinen Mengen Phosphor die Wirkung des proteolytischen Fermentes steigert.

Hauser¹⁾ hat den Einfluss zugesetzten Phosphors auf einige Fermente und synthetische Vorgänge untersucht, aber

¹⁾ Archiv f. experim. Pathol., Bd. 36.

nur eine Störung der Hippursäuresynthese in der Niere durch Phosphor nachweisen können. In ähnlichen — vielleicht nicht genügend variirten Versuchen — habe ich auf Zunahme der Ammoniakbildung durch Zusatz von Phosphor zu Leberfermentlösungen geachtet, aber keine gefunden.

Dass es sich bei der Phosphorvergiftung um eine Steigerung des autolytischen Spaltungsvorganges handelt, wird dadurch besonders deutlich, dass sich entsprechende Veränderungen auch am Blut nachweisen lassen.

Zunächst konnte mehrfach die alte Beobachtung, dass auf der Höhe der Vergiftung das Blut häufig völlig ungerinnbar angetroffen wird, bestätigt werden. Man kann solches Blut lange Zeit auf Eis aufheben, ohne dass es äusserlich Veränderungen zeigt. Nur setzen sich allmählich die Blutkörperchen ab.

Ebenso wurden häufig an den verschiedenen Organen die so oft beschriebenen starken Blutungen constatirt, unter anderem auch in der Leber. Diese Leberblutungen hat nach Aufrecht¹⁾ Frerichs bei acuter gelber Atrophie zuerst beobachtet; Aufrecht hält sie für hochgradig und häufig.

Ferner konnten wir feststellen, dass Phosphorblut nicht nur unter Umständen ungerinnbar ist, sondern auch im Stande, Gerinnsel zu lösen.

Einem mit Phosphor vergifteten Hunde wurde, bevor die Vergiftungserscheinungen auf der Höhe angelangt waren, aus einer kleinen Arterie Blut entnommen, welches noch gut gerinnbar war. Die kleine Arterie wurde nicht unterbunden, das Blut gerann spontan. Zwei Tage später blutete das Thier aus der alten Arterienwunde. Jetzt wurde ihm aus einer anderen Arterie 160 ccm. Blut entnommen, das nunmehr völlig ungerinnbar war. Offenbar hatte sich der Thrombus der ersten Gefässwunde wieder gelöst.

In zwei darauf hin geprüften Fällen konnte in dem un-

¹⁾ Aufrecht, Leberatrophie und Lebercirrhose, in Eulenburg's Realencyclopädie, III. Aufl.

gerinnbaren Phosphorblut kein Fibrinogen mit Hülfe der Ammonsulfatfractionirung nachgewiesen werden, während bei Gerinnungshemmung durch Witte-Pepton oder Blutegelextract Fibrinogen immer im Blut angetroffen wurde. Das Fehlen des Fibrinogens im Phosphorblut, das schon von Corin und Ansiaux¹⁾ beobachtet wurde, genügt allein, um die Ungerinnbarkeit zu erklären.

Fügte man zu dem Phosphorblut normales Blut, so trat zunächst völlige Gerinnung des Gemisches ein, dann aber allmählich wieder Lösung der Gerinnung, die schon in einigen Stunden sehr deutlich war und dann weiter fortschritt.

Injicirte man grössere Mengen ungeronnenen Phosphorblutes einem Hunde intravenös, so trat eine ganz vorübergehende, aber deutliche Verminderung der Gerinnbarkeit des Blutes auf, die allerdings nur unbedeutend im Verhältniss zu der Wirkung von injicirtem Witte-Pepton bei demselben Thier war.

Diese Befunde am Phosphorblut, deren genauere Analyse noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein muss, haben im Rahmen dieser Arbeit insofern Interesse, als sie sich neben der Lebererkrankung finden. Bedenkt man, dass das proteolytische Ferment der Leber das Globulin (incl. des Fibrinogens) zum Verschwinden bringt,²⁾ nicht aber das Albumin, so liegt die Vermuthung nahe, dass das Verschwinden des Fibrinogens auf die Wirkung des auch in der Leber wirksamen Fermentes zu beziehen ist.

Ob dieses Ferment mit jenem der normalen Autolyse identisch ist und nur bei Phosphorvergiftung (acuter gelber Leberatrophy) aus noch nicht bekannten Gründen sehr reichlich gebildet wird, ob es nicht eventuell einer Secundärinfection durch Bakterien entstammt und das Leben der inficirenden Organismen überdauert, ob es nicht endlich von einer noch unbekannten Bildungsstätte her dem Blute und der Leber zugeführt wird, ist zur Zeit nicht zu übersehen.

1) Vierteljahrschrift f. gerichtl. Medicin, 1894, cit. nach Maly's Jahreshb.

2) Siehe darüber die vorangehende Arbeit S. 167.

Doch sei nur kurz hervorgehoben, dass eine ganze Reihe der bei Phosphorvergiftung charakteristischen Erscheinungen, Leber- und Blutveränderungen, Arrosion der Gefässe, vielleicht auch der Fetttransport sich durch eine Veränderung der fermentativen Vorgänge erklären lässt.

Dass die Analogie der Phosphorvergiftung mit der acuten Leberatrophie durch den an der Leber gemachten Befund noch augenfälliger wird, bedarf kaum der Erwähnung. Dabei ist die mehrfach angedeutete Beziehung der Phosphorvergiftung zu fermentartigen Vorgängen zum ersten Mal sicher darge-
gethan.

Schultzen und Riess¹⁾ vergleichen den Phosphor mit einem Ferment in der Art seiner Wirkung.

Nasse²⁾ hält die Verfolgung von Fermentprocessen bei Anwesenheit von Phosphor und ähnlichen Stoffen für dringend geboten, da er die bisherigen Erklärungsversuche der Wirkung von Phosphor für einseitig hält.

Quincke³⁾ äussert sich, nachdem er die bisherigen Anschauungen über die Entstehung der acuten Leberatrophie besprochen hat, in seinem kürzlich erschienenen Handbuch der Lebererkrankungen folgendermassen:

«Schliesslich möchte ich selbst auf eine bisher nicht erwogene Möglichkeit der Entstehung hinweisen: Die Gemeinsamkeit der Ausführungsgänge von Leber und Pankreas in ihrem letzten Ende lässt es als möglich erscheinen, dass bei Verschluss der gemeinsamen Mündung in den Darm das Pankreassecret in die Gallenwege gelangt und dass das Trypsin so seine verdauenden Wirkungen auf die Leberzellen entfalten kann in denjenigen Theilen der Drüse, wo es bis zu den Capillaren vorgedrungen ist. Ob diese Hypothese für gewisse

1) Charité-Annalen XV, 1869 (nicht im Original zugänglich).

2) Nasse, Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz, Leipzig 1882.

3) Quincke und Hoppe-Seyler, Krankheiten der Leber in Nothnagel's Handbuch.

Fälle berechtigt ist, wird nur eine darauf gerichtete Untersuchung in jedem Falle entscheiden können.»

Von Interesse ist ferner, dass Petry¹⁾ in malignen Geschwülsten autolytische Veränderungen im Sinne von Salkowski beschrieben hat.

Schliesslich sei noch angeführt, dass pathologisch-anatomisch das Auftreten von Vacuolen und Verminderung der protoplasmatischen Bestandtheile der Leber bei Phosphorvergiftung besonders hervorgehoben wird. Ziegler und Obolonsky²⁾ kommen auf Grund von Thierversuchen zu dem Schluss, dass eine Zelldegeneration besteht, welche man wohl am ehesten als einen hydropischen Zustand, verbunden mit einer Verminderung der protoplasmatischen Bestandtheile der Zelle, ansehen kann.

Nachdem nunmehr durch die vorliegende Arbeit festgestellt ist, dass Aenderungen der Fermentprocesse im Organismus eine bedeutsame Rolle in der Pathologie der Phosphorvergiftung spielen, wird man versuchen müssen, diese Phosphorwirkung in ihren einzelnen Etappen zu analysiren. Sodann werden fernere Untersuchungen die in dieser Arbeit bereits gestreifte, sehr naheliegende Beziehung zu der Pathogenese der Infectiouskrankheiten ins Auge fassen müssen, eine Perspective für weitere Forschung, die hier nur angedeutet werden kann.

1) Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. XXVII, Heft 4 und 5, 1899.

2) Beiträge zur pathol. Anatomie, 1888.

Ueber die Beeinflussung der Eiweisscoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen.

Von

K. Spiro.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 36.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

Gelegentliche Beobachtungen, welche ich über das Ausbleiben der Eiweisscoagulation bei Gegenwart von anscheinend indifferenten Stoffen machte, haben mich veranlasst, den Einfluss einer Anzahl von organischen Substanzen nach dieser Richtung zu untersuchen. So überraschend zunächst einige Befunde waren, so ergab doch die nachträgliche Durchsicht der Litteratur, dass vereinzelt ähnliche Beobachtungen schon früher zur Beschreibung gelangt sind, ohne jedoch irgendwie Beachtung zu finden. Bei der Wichtigkeit der Eiweisscoagulation für nahezu alle biologisch-chemischen Untersuchungen schien mir eine Verfolgung des Gegenstandes um so mehr geboten, als sich daran die Hoffnung knüpfte, durch Vermehrung des Thatfachenmaterials neue Anhaltspunkte für die Aufklärung des so dunklen Coagulationsvorganges zu gewinnen.

Als Eiweissmaterial für eine derartige Untersuchung wäre derzeit, streng genommen, die durchgängige Verwendung von einheitlichem krystallisiertem Eiweiss geboten gewesen. Doch scheinen für die vorliegenden, im Allgemeinen mehr orientirenden Versuche zunächst die soviel leichter zu beschaffenden nativen Eiweisslösungen um so mehr zu genügen, als die an ihnen erhaltenen Befunde allein für praktische Zwecke von Bedeutung sind und zum Vergleich mit älteren

Beobachtungen derselben Richtung herangezogen werden können.

Zumeist benutzte ich Eierklar, seltener Blutserum vom Pferd. Letzteres eignet sich, wie ganz allgemein schon seit Heynsius bekannt, zu Coagulationsversuchen durchaus nicht so gut wie das Hühnereiereiweiss. Gelegentlich wurde auch bei einzelnen Versuchen vom Globulin (durch Ammonsulfat) befreites Eieralbumin benutzt oder krystallisirtes Serumalbumin, das nach dem von Pemsel ausgearbeiteten Verfahren¹⁾ dargestellt war.

Für die Darstellung der Eiweisslösungen wurde das Eierklar von frischen Eiern mit der Scheere zerschnitten, geschlagen und im Eisschrank absetzen gelassen. Das abgegossene Eiweiss war bisweilen so stark alkalisch, dass ein Einfluss auf die Gerinnung statt hatte; daher wurde stets angesäuert, und zwar mit saurem Kaliumphosphat bis zur deutlich sauren Reaction gegen Lackmuspapier — oder mit verdünnter Essigsäure zunächst bis zur sauren Reaction gegen Congo, worauf dann Natriumphosphat zugegeben wurde, bis die saure Reaction gegen Congo verschwand, die Lösung aber gegen Lackmus noch schwach sauer reagirte. Als bestes Kriterium für die richtige Ansäuerung darf die Filtrirbarkeit der Eiweisslösungen gelten, denn namentlich die mit Kaliumhydrophosphat angesäuerten Lösungen filtriren überraschend schnell. Ebenso gelingt in solchen Proben die Coagulation leicht und vollständig, so dass auch die Filtration von den Coagulis schnell und gut vor sich geht.

Die Coagulation selbst wurde in Reagensröhrchen vorgenommen; die Anwendung von Capillarröhrchen, wie sie bei der Schmelzpunktbestimmung üblich ist, verbot sich, obgleich die geringe dabei nothwendige Quantität das Verfahren a priori einladend erscheinen lässt, aus mehreren Gründen. Einerseits ist die Temperaturablesung genauer, wenn das Thermometer direkt in der Flüssigkeit sich befindet, während in den Capillaren leicht zu starke Erhitzung eintritt, andererseits kann der Vorgang der Gerinnung in den Capillaren im Einzelnen nicht mit der wünschenswerthen Genauigkeit beobachtet werden, namentlich ob bei einer bestimmten Temperatur nur Opalescenz oder schon Trübung oder bereits flockige

¹⁾ Siehe Hans Th. Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer, thierischer Eiweissstoffe. Inaug.-Diss. Strassburg i. E. 1898.

Abscheidung auftritt; zudem schliesst sich dieses Verfahren bei jenen Versuchen, wo die Vollständigkeit der Hitzecoagulation eventuell am Filtrat geprüft werden soll, von selbst aus.

Bezüglich der Geschwindigkeit des Erhitzens bin ich von dem üblichen Verfahren der meisten Beobachter bewusst aus folgenden Gründen abgewichen. Namentlich Corin (und Ansiaux)¹⁾ haben den Gerinnungspunkt bei äusserst langsamem Ansteigen der Temperatur bestimmt, was für einzelne Fälle gewiss durchaus zweckmässig ist. Bei den Schmelzpunktbestimmungen kann die Erhitzung beliebig langsam vorgenommen werden, wenn beim Schmelzungs Vorgang keine Zersetzung stattfindet, d. h. wenn es sich um einen einfachen reversiblen Vorgang handelt. Findet dabei jedoch eine chemische Veränderung, ein irreversibler Vorgang statt, so wird in neuerer Zeit ganz allgemein (E. Fischer²⁾) hat wiederholt auf die Nothwendigkeit dieses Vorgehens hingewiesen) jener Punkt als Schmelzpunkt (resp. Zersetzungspunkt) angegeben, wo bei schnellem Erhitzen Schmelzung resp. Zersetzung stattfindet. Da es sich beim Coaguliren regelmässig um eine mit einer Umsetzung einhergehende Zustandsänderung, einen irreversiblen Process handelt, muss auch hierbei zur genauen Fixation des Coagulationspunktes schnell erhitzt werden. Im Uebrigen kam es für die vorliegenden Untersuchungen, die, an nicht einheitlichem Material ausgeführt, auch nicht die Beibringung absoluter Zahlen (physikalischer Constanten) bezwecken konnten, mehr auf ein unter sich für die einzelnen Versuchsreihen vergleichbares Zahlenmaterial an. Dies wurde freilich erst nach einiger Uebung durch mannigfache Vorversuche erreicht.

Die Anordnung der Versuche entsprach im Wesentlichen derjenigen, die W. Pauli³⁾ kürzlich publicirt hat: durch ein

1) Bulletins de l'Academie royale des sciences etc. de Belgique, 3^{me} série, Bd. 15, S. 643, 1888 und ebenda Bd. 21, S. 321, 1891.

2) Vgl. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 20, S. 827. 1887 und Bd. 21, S. 987, 1888.

3) Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweisskörper. Pflüger's Archiv, Bd. 78, S. 315, 1899.

an das äussere Glassgefäss geheftetes Schriftstück konnte an dem Verschwinden von Buchstaben ein bestimmter Punkt als Coagulationspunkt festgehalten werden; es wurden Buchstaben von dicker Schrift gewählt, da nicht der Beginn der Trübung, sondern das Ausfallen eines flockigen, dicken Niederschlages als Coagulationspunkt angesehen wurde.

Die Nothwendigkeit, bei vergleichenden Untersuchungen eine gleichmässige Verdünnung des Eiweisses zu wählen, ähnlich wie dies für die Salzfällung in den Arbeiten F. Hofmeister's und seiner Schüler geschieht, ergab sich aus der Nothwendigkeit, bei gleichem Salzgehalt zu arbeiten, und aus der bereits mehrfach gemachten Beobachtung,¹⁾ dass mit steigender Concentration der Hühnereiweisslösung die Gerinnungstemperatur sinkt. Auch für andere Eiweisskörper als diejenigen des Eierklars scheint diese Gesetzmässigkeit zu gelten, denn Hammarsten²⁾ gibt gelegentlich seiner Studien über das Paraglobulin an, dass drei Proben seines Präparates, welche 2,6, bzw. 1,72 und 0,86% enthielten, die Coagulation bei 68, 71 und 74° C. zeigten.

Als Beispiele für den Einfluss der Concentration der Eiweisslösung auf die Gerinnungstemperatur folgen zwei Protokolle:

Protokoll I und II.

ccm. Wasser	ccm. Albu- min- lösung	Gerinnungspunkt			
		Eiweisslösung I		Eiweisslösung II	
9	1	60,6	60,6	60,2	60,0
8	2	60,6	60,4	59,3	59,1
7	3	60,0	60,2	58,2	58,4
6	4	59,5	59,7	57,5	57,3

1) K. V. Starke (bei Hammarsten) erwähnt gelegentlich seiner Studien über Eieralbumin, dass dasselbe in 1—3%iger Lösung fast constant bei 56° coagulirt wird, mit steigender Verdünnung jedoch die Gerinnungstemperatur steigt und sehr verdünnte Lösungen erst beim Sieden nach Säurezusatz gerinnen (cf. Maly's Jahresbericht, Bd. 11, S. 19, 1881). Vgl. auch Pauli, a. a. O, S. 320.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 18, S. 65. 1878.

ccm. Wasser	ccm. Albu- min- lösung	Gerinnungspunkt			
		Eiweißlösung I		Eiweißlösung II	
5	5	59,2	59,0	56,7	56,9
4	6	58,8	58,6	56,8	56,8
3	7	58,5	58,4	56,8	56,6
2	8	58,2	58,2	56,5	56,4
1	9	57,8	57,6	56,2	56,0
0	10	57,2	57,2	56,0	56,0

In zwei anderen Versuchsreihen, die in derselben Art angestellt wurden, stieg der Gerinnungspunkt bei der zehnfachen Verdünnung um 2,2 resp. 2,8° im Mittel der Zahlen.

Man könnte vielleicht geneigt sein, gegen dieses Resultat einzuwenden, dass die Verschiebung des Gerinnungspunktes nur eine scheinbare sei, bedingt dadurch, dass in verdünnteren Lösungen die Masse der coagulablen Substanz geringer sei und so die schwerer erkennbare Coagulation auch erst bei höherer Temperatur sich zeige, daher die allmähliche flockige Ausfällung auch erst später deutlich werde. Hiergegen kann jedoch eingewandt werden, dass, wie aus den obigen Protokollen ersichtlich, die Depression des Gerinnungspunktes auch schon bei geringer Verdünnung recht concentrirter Lösungen deutlich in Erscheinung tritt, also auch da zu erkennen ist, wo die Menge der coagulablen Substanz noch gross ist. Ferner handelt es sich ja auch bei der Coagulation nicht um einen mit steigender Temperatur allmählich verlaufenden Process, sondern um einen solchen, der, an eine bestimmte Temperatur geknüpft, bei dieser vollständig vor sich geht, so dass also das spätere Gerinnen nicht als eine Verzögerung angesehen werden kann.

Da ich meine Coagulationsversuche zum Theil auch in alkoholischer Lösung ausgeführt habe, sei in dieser Richtung Nachstehendes bemerkt. Die alkalische Reaction des nativen Eiereiweisses oder des Serums ist zwar deutlich, aber doch nur ganz ausnahmsweise so stark, dass nicht durch die

gleichzeitig vorhandenen Salze, wenn wenigstens nicht allzu stark verdünnt wurde, eine sichtbare Wirkung verhindert wäre. Wohl aber ist in genuinen Eiereiweisslösungen die alkalische Reaction deutlich genug, dass sie beim Erwärmen in alkoholischer Lösung in Wirkung tritt. Wiederholt wurden Eiereiweisslösungen angetroffen, die zwar für sich oder nach Zufügung des doppelten Volumens Wassers, aber nicht mehr nach Zufügung des doppelten Volumens Alkohol in der Hitze gerannen. Es muss daher bei Untersuchung in alkoholischer Lösung auf diesen Umstand Bedacht genommen werden, doch soll dieser Punkt erst bei Mittheilung anderer Versuche ausführlicher erörtert werden.

Ich berichte im Nachstehenden zunächst über Versuche, welche den Einfluss stickstoffhaltiger Stoffe auf den Gerinnungsvorgang zeigen, wobei neben den eigenen Erfahrungen ältere einschlägige Beobachtungen, soweit sie mir bekannt geworden sind, angeführt werden sollen. Von den in der Litteratur hierüber vorliegenden Angaben müssen an erster Stelle die Versuche über die Wirkung von Cholin auf Eiweiss genannt werden, die J. Mauthner¹⁾ bereits im Jahre 1874 veröffentlicht hat. Derselbe stellte fest, dass Fibrin in Cholinlösung sehr stark aufquillt und sich dann vollständig auflöst, dass auch Hühnereiweiss mit Cholin gekocht werden kann, ohne dass Gerinnung auftritt, und dass auch coagulirtes Hühnereiweiss durch Cholin in Lösung gebracht werden kann. Das entstandene Produkt fasste Mauthner als eine dem Kalialbuminat analoge Verbindung, als Cholinalbuminat auf.

¹⁾ Medic. Jahrbücher, 1874, S. 347: «Ueber das Verhalten des Neurins gegen Eiweisskörper». Nach der in der vorhergehenden Arbeit (Liebig's Annal. der Chem., Bd. 166, S. 202) mitgetheilten Darstellungsweise und den Eigenschaften konnte es keinem Zweifel unterliegen, dass das von Mauthner benutzte Präparat nicht «Neurin» im heutigen Sinne, d. h. nicht die Oxyvinylbase, sondern die Oxäthylbase war, also nach der heutigen Terminologie als «Cholin» zu bezeichnen ist. Herr Professor Dr. Mauthner hatte die Freundlichkeit, mir auf meine Anfrage dies zu bestätigen und mich zur Richtigstellung der von ihm seiner Zeit gebrauchten und in die Litteratur übergegangenen Benennung zu autorisiren.

Ganz ebenso wie das Cholin verhält sich nach meinen Erfahrungen auch das Piperidin. Durch Zufügung desselben zu Eiweisslösungen wird ein mehr oder weniger grosser Theil des Eiweisses der Coagulation entzogen, ebenso wie auch coagulirtes Eiweiss durch Piperidin in Lösung gebracht werden kann. Die Anwesenheit von Eiweiss in diesen Lösungen lässt sich in sehr einfacher Weise zeigen, indem man der zu untersuchenden Lösung einen Tropfen verdünnter Kupfersulfatlösung zufügt: es tritt eine rothviolette Färbung auf, der Biuretreaction der Albumosen im Farbenton etwa entsprechend. Für die Anstellung der Biuretprobe ist also die Anwesenheit eines fixen Alkalis nicht nothwendig, es genügt vielmehr die Gegenwart einer starken Base, wie des Piperidins. Bei der Ueberführung des Hühnereiweisses in die auch bei der Siedehitze nicht mehr gerinnende Modification findet übrigens keine oder nur eine geringe Schwefelwasserstoffabspaltung statt, das entstehende Produkt gibt noch recht intensiv die Reaction mit Bleiessig auf abspaltbaren Schwefel.

Aber auch Basen, die eine starke fällende Wirkung auf Eiweiss ausüben, können doch noch einen Theil des Eiweisses so verändern, dass derselbe der Coagulation entzogen wird; dies gilt z. B. für Pyridin und Anilin. Pyridin ist, wie aus dem beifolgenden Protokoll hervorgeht, ein sehr starkes Fällungsmittel für Eiweiss und setzt den Gerinnungspunkt desselben herab, dennoch vermag es Eiweiss beim Sieden in Lösung zu halten.

Protokoll III.

ccm. Wasser	ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Pyridin	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
8,0	2,0	0,0	62,0	61,8	
7,8	2,0	0,2	52,0	52,0	
7,6	2,0	0,4	45,5	45,6	Deutliche Trübung
7,4	2,0	0,6	—	—	Beginn der Fällung

Das für Pyridin Gesagte gilt auch für Anilin (und dessen Homologe), dessen eiweissfällende Wirkung schon

Heintz¹⁾ gefunden und O. Nasse²⁾ bestätigt hat. Von den Homologen des Anilins wirken wie dieses Orthotoluidin (nicht Paratoluidin) und Xylidin, dagegen wird durch den Eintritt von Nitrogruppen die fällende Wirkung des Anilins ebenso aufgehoben, wie wir dies in einem späteren Abschnitt beim Phenol sehen werden.

Neben diesen stark basischen Aminen sind jedoch auch andere stickstoffhaltige organische Verbindungen im Stande, Eiweiss mehr oder weniger vor der Ausfällung zu schützen, auch solche, die nicht ausgesprochene Basen sind. Hierher gehören die Säureamide, Amidosäuren, Harnstoffe und Senföle.

Das Urethan z. B., das einerseits in concentrirter Lösung Eiweiss ausfällt, vermag andererseits die vollständige Coagulation einer Eiweisslösung zu hindern, wie das folgende Protokoll zeigt.

Protokoll IV.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. 50 % Urethan	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2,0	8,0	0,0	63,0°	63,0°	
2,0	7,0	1,0	57,4°	57,2°	
2,0	6,0	2,0	Trübung, bei ca. 50° keine vollständige Gerinnung		Beim Erhitzen auf 100° bleibt Eiweiss zum Theil in Lösung.
2,0	5,0	3,0	Fällung		Die Fällung ist gallertig.

Während somit angesäuertes Eiereiweiss durch Urethan gefällt wurde, zeigte Pferdeblutserum auf Zusatz einer gesättigten Urethanlösung nur eine Trübung. Kocht man Serum mit einer genügenden Menge Urethan hinreichend lange, so tritt auch nach dem Ansäuern mit Essigsäure keine Coagulation ein, sondern die für Alkalialbuminatbildung typische Gallertbildung, die in der Hitze wieder verschwindet.

Der besonderen Verhältnisse halber seien für das Formamid z. B. mehrere Protokolle gegeben, da dasselbe, ähn-

¹⁾ Lehrbuch der Zoochemie, S. 643, Berlin, 1853.

²⁾ Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz, Leipzig, 1882, S. 14.

lich wie dies nach W. Pauli's systematischen Untersuchungen für einige Salze gilt, in niederer Concentration (10 %) den Gerinnungspunkt erhöht, in höherer jedoch herabsetzt, und bei einem Gehalt von ca. 25 % zu fällen beginnt. — Das Acetamid soll nach O. Nasse stärker fällen als Formamid (?), Oxamid und Benzamid überhaupt nicht.

Protokoll V. Formamid.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Forma- mid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2,0	8,0	0,0	60,8	61,0	Klar Die Flüssigkeit trübt sich in der Kälte, allmählich Niederschlag Fällung in der Kälte. Beim Erhitzen bleibt Eiweiss in Lösung
2,0	7,0	1,0	64,6	64,8	
2,0	6,0	2,0	59,0	59,4	
2,0	5,0	3,0	53,8	53,4	

Protokoll VI. Formamid.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Forma- mid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2,0	8,0	0,0	62,0	62,2	In der Kälte Spur Trübung Trüb, beginnende Fällung Deutliche Fällung Filtrat von der Fällung ist eiweisshaltig, zeigt beim Erhitzen keine Gerinnung
2,0	7,0	1,0	65,2	65,4	
2,0	6,0	2,0	61,3	61,1	
2,0	5,0	3,0	54,0	53,8	
2,0	4,0	4,0	—	—	

Protokoll VII. Formamid.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Forma- mid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2,0	8,0	0,0	60,5	60,4	
2,0	7,8	0,2	60,7	60,8	
2,0	7,6	0,4	61,0	61,1	
2,0	7,4	0,6	61,9	62,1	

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Forma- mid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2,0	7,2	0,8	63,8	63,4	
2,0	7,0	1,0	64,4	64,4	
2,0	6,8	1,2	62,9	63,5	
2,0	6,6	1,4	62,6	62,7	
2,0	6,4	1,6	62,0	62,1	
2,0	6,2	1,8	61,4	61,7	
2,0	6,0	2,0	60,6	60,2	
2,0	5,8	2,2	56,6	56,2	
2,0	5,6	2,4	54,0	54,2	In der Kälte Beginn der Fällung.

Harnstoff dagegen treibt den Coagulationspunkt bei niederen Concentrationen stark in die Höhe und verhindert die Gerinnung bei höherer Concentration sogar vollständig. Ich gebe nur ein Protokoll:

Protokoll VIII. 50%ige Harnstofflösung.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Harn- stoff- lösung	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
1,0	9,0	0,0	60,5	60,5	
1,0	8,8	0,2	61,2	61,5	
1,0	8,6	0,4	63,2	63,7	
1,0	8,4	0,6	65,0	65,2	
1,0	8,2	0,8	66,3	66,5	
1,0	8,0	1,0	Trübung bei ca. 67°		Selbst bei 100° nur unvollständige Ausfällung.

Neben diesem Verhalten gegenüber Eiweisslösungen zeigt der Harnstoff — und ganz gleich verhält sich der Sulfoharnstoff — auch auf coagulirtes Eiweiss eine starke Einwirkung: so wurde gut ausgewaschenes Fibrin sowohl beim Kochen als auch bei Brutschranktemperatur zunächst zu starkem Aufquellen gebracht und dann vollkommen gelöst, auch (durch Hitze) coagulirtes Hühnereiweiss kann man durch Harnstofflösung wieder in Lösung bringen. In wie hohem Grade endlich der Harnstoff auch die Coagulation von Eiweiss durch Alkohol zu hindern vermag, wird später auf Grund quantitativer Versuche des Näheren auseinander gesetzt werden.

Diese Einwirkung des Harnstoffs auf Eiweiss scheint geeignet, manche Angabe in der Litteratur zu ergänzen resp. zu erläutern. So schreibt Phil. Limbourg in seiner Arbeit «Beiträge zur chemischen Nervenreizung und zur Wirkung der Salze»: ¹⁾ «Legt man einen Froschmuskel in starke Harnstofflösung, so wird er sulzig, lässt sich leichter zerdrücken, die Sehne ist unschwer abzuziehen — man erhält eine schleimige, fadenziehende, bei geringem Erwärmen in Wasser lösliche Masse. — Es handelt sich vielleicht um einen katalytischen Vorgang. Schwefelharnstoff zeigt dieselbe Wirkung, dagegen nicht salpetersaurer oder oxalsaurer Harnstoff, welche nur eine geringe Löslichkeit besitzen.» Derselbe Autor hat dann später gelegentlich seiner Untersuchungen über die Einwirkung von Salzen auf Fibrin ²⁾ auch die Löslichkeit von Fibrin in Harnstoff gefunden, auch die Uncoagulirbarkeit seiner Harnstoffeiweisslösungen richtig beobachtet, ohne jedoch die Sache, die er für einen rein physikalischen Vorgang anzusprechen geneigt ist, weiter zu verfolgen. Da er zudem die Fibrinauflösung in Gegenwart von Salzen derjenigen durch Harnstoff vollkommen an die Seite stellt, so braucht auf die einschlägigen Betrachtungen Limbourg's nicht des Ausführlichen eingegangen zu werden.

Die eiweisslösende Wirkung des Harnstoffs wird jedoch auch sonst bisweilen in Erscheinung treten, und je nach dem Harnstoffgehalt werden daher eventuell auch in harnstoffhaltigen Flüssigkeiten bezüglich der Coagulation von Eiweisskörpern Verschiedenheiten auftreten. Die Berechtigung dieser Vermuthung muss allerdings im einzelnen Fall durch direkte Untersuchung erwiesen werden. Herr Prof. Hofmeister hat mich z. B. darauf aufmerksam gemacht, dass dies Verhalten zur Erklärung der sich widersprechenden Angaben über den Bence-Jones'schen Eiweisskörper beizutragen geeignet ist. Die nachfolgende Arbeit von Herrn Dr. A. Magnus-Levy aus dem hiesigen Institut bringt eine solche auf den Bence-Jones'schen Eiweisskörper bezügliche Untersuchung.

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. 41, S. 303, 1887.

²⁾ Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 450, 1889.

Als stickstoffhaltige organische Verbindungen, die im Stande sind, Eiweiss mehr oder weniger vor der Ausfällung durch Hitze zu schützen, sind endlich noch die Senföle zu nennen. Die Wirkung der letzteren auf Eiweissstoffe ist schon vor längerer Zeit von R. Buchheim festgestellt: «Wahrscheinlich werden die eiweissartigen Körperbestandtheile durch sie verändert, wenigstens wird durch das gewöhnliche (Allyl-)Senföl die Gerinnung des Hühnereiweisses durch Kochen verhindert.»¹⁾ O. Nasse hat dies dann für die anderen Homologen bestätigt: «Alle Senföle, welche ich erhalten konnte, Methyl-, Aethyl-, Allyl- und Phenylsenföl fällen die Eiweisskörper nicht», «ein Zusatz derselben zur Eiweisslösung hebt deren Gerinnung auf.» «Nun ist aber dabei zu beachten», fährt O. Nasse fort, «dass die Gerinnung sofort und in der gleichen Weise wie bei der reinen Eiweisslösung eintritt, wenn der Mischung eine kleine Menge Säure, um so mehr, je mehr Senföl zugefügt war, zugesetzt wird. Die Senföle wirken also wie ein Alkali, bilden vielleicht eine Verbindung mit dem Eiweiss, eine Verbindung, die aber nicht fest sein kann, denn auch im zugeschmolzenen Rohre im Wasserbade erhitzt, tritt Gerinnung des Eiweisses auch bei reichlichem Zusatz von Senföl ein. Immerhin müsste ein Versuch, die interessante Beobachtung von Buchheim zu erklären, an die neutralisirende Wirkung der Säure anknüpfen!»

Da unter den bisher angeführten Stoffen, denen eine gerinnungshemmende Wirkung zukommt, sich Substanzen von sehr verschiedenem Aufbau finden, Basen, Säureamide, Senföle, so ist kaum als sicher anzunehmen, dass es sich überall um den gleichen Vorgang handelt.

Soweit die vorliegenden Beobachtungen einen Schluss gestatten, handelt es sich bei den basischen organischen Stoffen um eine den Alkalihydraten entsprechende Wirkung. Beim Cholin und Stoffen, deren basische Eigenschaften sich direkt, z. B. beim Zusammenbringen mit Indicatoren nachweisen lassen, ist dies anscheinend selbstverständlich. Aber

¹⁾ Lehrbuch der Arzneimittellehre, 3. Aufl., 1878, S. 383.

auch bei Aminen, welche zwar nicht auf Farbstoff wirken, aber doch sonst unzweifelhafte basische Eigenschaften zeigen, wie Anilin, Toluidin u. s. w., liegt diese Annahme bei Weitem am nächsten.

Weniger passend scheint zunächst eine Ausdehnung dieser Annahme auf die Säureamide und Harnstoffe. Doch lässt sich für den basischen Charakter derselben nicht bloss ihre Verbindungsfähigkeit mit Säuren anführen, sondern wir besitzen in der Reaktionsgeschwindigkeit und der elektrischen Leitfähigkeit ihrer Salze sogar ein Maass desselben. Von diesem Gesichtspunkt aus ist durch W. Ostwald¹⁾ wie für die anderen Basen auch für den Harnstoff in wässriger Lösung

eine hydroxylhaltige Formel z. B. $\text{CO} \begin{matrix} \text{NH}_2\text{OH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ wahrscheinlich gemacht. Zum Vergleich lasse ich einige der vorhandenen Zahlen über die Affinitätsgrössen der von mir untersuchten Verbindungen folgen, wie dieselben namentlich von Ostwald's Schülern J. Walker²⁾ und G. Bredig³⁾ festgestellt worden sind. Während die Muttersubstanz aller organischen Amine, das Ammoniak, eine ziemlich niedrige Dissociationsconstante ($K = 0,0023$) zeigt, ist dieselbe bei anderen Verbindungen sogar bisweilen recht erheblich, z. B. für

Piperidin $K = 0,158$ (direkt gemessen).

Auch das Neurin hat nach Ostwald eine hohe Dissociationsconstante wie alle quaternären Basen. Aehnliche Daten ergeben sich auch aus der von J. Walker gemessenen Leitfähigkeit der salzsauren Salzen; aus den hierbei erhaltenen Zahlen (Schwefelharnstoff 371,0; Acetamid 369,9; Harnstoff 368,6; Asparaginsäure 226,0; Asparagin 217,0; Glycocoll 195,3; Pyridin 108,1) seien diejenigen für das Anilin (99,4) und Nitrilanilin (376) hervorgehoben, die zeigen, dass in Uebereinstimmung mit den oben angegebenen Eigenschaften der beiden Basen bezüglich der fällenden Wirkung auf Eiweiss-

1) Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XXX, XXXIII u. XXXV.

2) Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. IV, S. 319, 1889.

3) Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. XIII, S. 289, 1894.

körper auch bezüglich der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Einfluss der Nitrogruppe sich sehr deutlich zeigt.

Auf Grund dieser Erfahrungen scheint das Verhalten concentrirter Harnstofflösungen gegen Eiweiss viel weniger überraschend. In der That gleicht, wie nunmehr gezeigt werden soll, das bei der Harnstoffeinwirkung entstehende Produkt in allen wesentlichen Punkten typischem Alkalialbuminat, so schon in seinem äusseren Habitus, indem es, namentlich bei höherer Concentration, eine sulzige, gallertige Masse darstellt. So auch in allen typischen Lösungs- und Fällungsreactionen: durch Zusatz verdünnter Säure wird es leicht abgeschieden, während es in concentrirter Salzsäure und auch in starker Essigsäure löslich ist, ebenso ist es auch in verdünnten Alkalien leicht löslich.

Weiter wurde die Eiweiss-harnstofflösung einer ausgiebigen Dialyse in fliessendem Wasser unterworfen. Dabei verblieb im Dialysirschlauch eine ziemlich stark opalisirende Flüssigkeit, aus der sich nichts abgeschieden hatte, ganz wie sich auch das Alkalialbuminat bei der Dialyse verhält. Eine solche von Harnstoff befreite Eiweisslösung zeigte nunmehr beim Erhitzen typische Gerinnung: auch dies stimmt mit den Erfahrungen am Alkalialbuminat überein, denn auch eine durch Dialyse alkaliarm gemachte Alkalialbuminatlösung gerinnt beim Sieden.

Hervorheben möchte ich endlich noch, dass zur Ausfällung der Verbindung ein bestimmter Säuregrad nöthig ist, und dass dazu ein Ueberschuss von Kaliumhydrophosphat ebenso schwer ausreicht, wie zur Fällung von Alkalialbuminat. Das tritt auch deutlich zu Tage bei der Bildung der Verbindung.

Versetzt man eine durch Kaliumhydrophosphat deutlich saure Eiweisslösung mit steigenden Quantitäten einer 50%igen Harnstofflösung, so tritt allerdings bei einem Gehalt von 1:10 noch eine geringe Coagulation ein, während dieselbe in einer schwach sauren Eiweisslösung, wie oben hervorgehoben, bei einem Gehalt von 0,4 ccm. Harnstofflösung in 10 ccm. vollkommen ausbleibt. Aber die Coagulation ist unvollständig, es

bleibt selbst bei Siedehitze viel Eiweiss in Lösung; setzt man mehr von der Harnstofflösung hinzu, so tritt keine Coagulation mehr ein, wie dies z. B. schon bei 2,0 ccm. Harnstofflösung zu 10 ccm. Gesamtmflüssigkeit der Fall ist.

Anscheinend anders gestaltet sich der Vorgang, wenn wir eine mit Essigsäure stark (deutliche Reaction gegen Congo) angesäuerte Eiweisslösung mit steigenden Quantitäten Harnstofflösung versetzen, wie folgendes Protokoll zeigen möge.

Protokoll X.

Eiweiss mit Essigsäure bis zur sauren Reaction gegen Congo-Papier angesäuert; Harnstofflösung 50 procentig.

ccm. Eiweiss- lösung	ccm. Wasser	ccm. Harn- stoff- lösung	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
1,0	8,0	1,0	70,4	70,6	Beim Erhitzen feine Flocken
1,0	7,0	2,0	67,2	67,6	" " trüb
1,0	6,0	3,0	63,5	63,2	" " "
1,0	5,0	4,0	58,5	—	" " "
1,0	4,0	5,0	49,5	50,0	" " "
1,0	3,0	6,0	51,5	52,0	" " "
1,0	2,0	7,0	70,1	70,4	Gerinnung unvollständig, viel in Lösung
1,0	1,0	8,0	—	—	Nur geringe Trübung
1,0	0,0	9,0	—	—	Bleibt klar.

Wie man sieht, wirkt Harnstoff in der stark sauren Eiweisslösung zunächst nur wie gewisse Salze, die den Coagulationspunkt herabdrücken, allmählich jedoch, allerdings erst bei hohen Concentrationen, wird die Wirkung der Essigsäure neutralisirt, und bei einem Gehalt der Lösung an Harnstoff von 45% ist die Coagulation vollkommen aufgehoben. Dieser Antagonismus zwischen Essigsäure und Harnstoff ist wohl als ein Beweis mehr anzusehen, dass letzterer bei seiner Wirkung wie eine typische Base fungirt.

Diese basische Valenz des Harnstoffs Säuren gegenüber, mit denen er keine beständigen Salze bildet, lässt sich durch Versuche zeigen, in denen die Verseifung von Essigäther durch Schwefelsäure nach Art der bekannten Versuche von

W. Ostwald als Maass gewählt wurde, wie es ähnlich schon für die Basen J. Walker in der oben citirten Arbeit mit Salzsäure gemacht hat. In parallelen Versuchsreihen, bei denen in der einen mit Wasser, in der anderen mit Harnstofflösung verdünnt wurde, verhielten sich die Mengen der vorhandenen Säuren (zugesetzten + neugebildeten) wie 14,85: 10,35, 15,05: 12,55, 19,3: 13,5, 25,00: 18,20, 28,2: 20,7, 47,7: 39,5 etc. Auch hier hat also Harnstoff die spaltende Wirkung von Ionen zu hindern vermocht, resp. Säure wie ein echtes Alkali neutralisirt.

Die Annahme, dass es in der Säureamidlösung Hydroxylionen sind, welche die coagulationhemmende Wirkung entfalten, setzt voraus, dass das Phänomen nur in wässriger Lösung auftritt. Dies lässt sich in der That am besten durch die Versuche am coagulirten Eiweiss zeigen. Wie oben hervorgehoben, vermögen in wässriger Lösung sowohl Harnstoffe als auch Piperidin coagulirtes Eiweiss aufzulösen; die Lösung wird durch Alkohol nicht gefällt. Dagegen geht keine Spur von Eiweiss in Lösung, wenn alkoholische Harnstofflösung oder Piperidinlösung angewandt wird oder Piperidin für sich mit Eiweiss erhitzt wird. Dies zeigt deutlich, dass für das Phänomen die Gegenwart von Wasser nöthig ist.

Wenn bei der Fähigkeit des Harnstoffs, Formamids etc., die Hitzegerinnung der nativen Eiweisskörper zu hindern, von der Bildung eines dem Alkalialbuminat ähnlichen Körpers die Rede war, so ist damit natürlich keine Identität des entstandenen Körpers mit den durch Alkalihydroxyde erhältlichen Produkten behauptet. Die viel intensivere Wirkung der fixen Alkalien führt frühzeitig zu chemischen Veränderungen, wie Ammoniak- und Schwefelwasserstoff-Abspaltung, welche bei Einwirkung der genannten Amide nicht beobachtet werden.

Es darf aber nicht ausser Augen gelassen werden, dass der Begriff des Albuminats selbst kein chemisch definirter ist, indem je nach der Intensität die Einwirkung von Alkalien nachweisbar Albuminate (resp. Albuminsäuren) mit verschiedenem Stickstoffgehalt (wie namentlich zuerst O. Nasse gezeigt hat), vermuthlich auch mit verschiedenem Schwefelgehalt

erhalten werden. Ueber die in solchen Fällen zweckmässige Nomenclatur wird wohl erst später eine Entscheidung getroffen werden können. Vorderhand wird es sich empfehlen, an dem Begriff, wie er sich aus den ursprünglichen Untersuchungen ergeben hat, festzuhalten, wobei das physikalische Verhalten des Alkalialbuminats die Hauptrolle spielte. In Bezug hierauf herrscht zwischen der Wirkung der Alkalien und des Harnstoffs eine vollkommene Analogie: Wie oben ausführlich gezeigt, vermag Harnstoff in geringerer Concentration bis zu 4% den Coagulationspunkt zu erhöhen, genau wie es verdünnte Alkalien thun¹⁾; bei höherer Concentration wird die Coagulation ganz verhindert, ja beide sind im Stande, coagulirtes Albumin wieder in wässrige Lösung überzuführen.

Wie oben erwähnt, hat O. Nasse auch in Betreff der Senfölwirkung die Analogie mit der Albuminatbildung betont. Bei dem chemischen Charakter der Senföle erscheint aber diese Annahme bedenklich, so geeignet sie ist, eine Uebereinstimmung mit dem sonst bei stickstoffhaltigen Stoffen beobachteten Verhalten herzustellen. Es darf vor Allem nicht ausser Betracht bleiben, was, als O. Nasse seine Vermuthung aussprach, noch nicht bekannt war, dass Senföle mit stickstoffhaltigen Substanzen leicht unter Bildung von Additionsprodukten reagiren: namentlich ist es bekannt, dass gerade mit den Spaltungsproducten des Eiweisses, den Amidosäuren, die Senföle unter Bildung von Thiohydantoinen sich umsetzen. Nachdem O. Aschan²⁾ dies zuerst festgestellt und die Natur der entstehenden Verbindungen erkannt hatte, haben W. Marckwald, M. Neumark und R. Stelzner³⁾ gezeigt, dass alle Amidosäuren in alkalischer Lösung bereits in der Kälte unter starker Erhitzung mit allen Senfölen unter Bildung der entsprechenden

¹⁾ Was Halliburton (Journ. of Phys., Bd. V, S. 152, 1884) für die Eiweisskörper des Serums gezeigt hat, dass durch Zusatz verdünnten Alkalis der Opalescenzpunkt (allmählich von 70° auf 73° C.) und der Coagulationspunkt (von 76° auf 80° C.) steigt, gilt nach eigenen Erfahrungen auch für andere Eiweisskörper.

²⁾ Berl. Berichte, Bd. XVI, S. 1544, 1883 u. Bd. XVII, S. 426, 1884.

³⁾ Ebenda, Bd. XXIV, S. 3278, 1891.

Thiohydantoinensäuren reagiren, ein Verfahren, das erst kürzlich wieder von F. Röhm ann¹⁾ zur Abscheidung des Leucins aus dem Rohleucin verwendet wurde. Ich möchte daher für die Erklärung des Ausbleibens der Eiweisscoagulation bei der Behandlung von Albumin mit Senfölen die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass es sich um Bildung von Senföleiweissverbindungen handelt.

1) Ebenda, Bd. XXXI, S. 2188, 1898.

Ueber den Bence-Jones'schen Eiweisskörper.

Von

Adolf Magnus-Levy,

Assistent der medicin. Klinik in Strassburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 37.)

(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

Im Jahre 1847 entdeckte Bence-Jones*¹⁾ im Urine eines von Mac-Intyre behandelten Patienten einen eigenthümlichen Eiweisskörper. Dieser unterschied sich von den gewöhnlich im Harne vorkommenden dadurch, dass der beim Erwärmen des Urins entstandene Niederschlag sich beim Kochen löste, um beim Erkalten wieder aufzutreten. Beim Erhitzen auf 100° ging der Niederschlag abermals in Lösung u. s. w. Auch die durch Salpeter- oder Salzsäure bei Zimmertemperatur erhaltenen Fällungen verschwanden bei 100°. Im Uebrigen zeigte der Körper nach verschiedenen Reactionen (Biuretreaction) und Elementaranalyse die Eigenschaften und Zusammensetzung der Eiweisskörper. — Erst in den achtziger Jahren wurde diese Substanz von neuem beschrieben. Kühne*) publizirte 1880 seine Untersuchungen über jenen eigenthümlichen Harnkörper, den er schon 13 Jahre vorher aus dem Urine eines von M. Doornik (Stokvis) behandelten Patienten isolirt hatte. Es gelang ihm, jene Substanz «ihrer gänzlichen Beziehungslosigkeit im Systeme der Eiweisskörper zu entkleiden». Sie wies eine so weit gehende Aehnlichkeit mit der damals von ihm aus den Verdauungsprodukten des Eiweisses isolirten «Hemialbumose» auf, dass Kühne sie als dieser auf das Nächste verwandt ansprechen konnte. Seit jener Zeit spricht man von einer (Bence-Jones'schen) «Hemialbumosurie».

*) Siehe Litteraturverzeichniss im Anhang.

Die Aufklärung der nosologischen Bedeutung, der klinischen Stellung des seltenen Körpers ging aus der Feder jenes Autors hervor, der den dritten Fall zusammen mit Huppert im Jahre 1888 beschrieb, aus der Feder Kahlers.³⁾ Er fand bei der Section eines Patienten, der den mit so auffallenden Eigenschaften begabten Eiweisskörper im Harn ausgeschieden hatte, zahlreiche Myelome im Mark der Rippen; er hielt sich für berechtigt, zugleich im Hinblick auf die zwei früheren, anatomisch und klinisch freilich nicht so genau differenzirten Fälle, einen Zusammenhang zwischen der «Hemi-albumosurie» und dem Auftreten der Myelome in den Rippen aufzustellen.

In den neunziger Jahren, namentlich in der zweiten Hälfte derselben, haben sich die Beobachtungen rasch gemehrt. Stokvis-Ribbink-Zeehuysen,⁴⁾ Matthes-Neumeister-Seegelken,⁵⁾ Rosin-Süssmann,⁶⁾ Ellinger⁷⁾ brachten ausführlichere Untersuchungen namentlich über die chemische Natur des Eiweisskörpers, Bozzolo,⁸⁾ Naunyn,⁹⁾ Sternberg,¹⁰⁾ Bradshaw,¹¹⁾ Askanazy,¹²⁾ Fitz^{13a)} kürzere Mittheilungen. Die von Kühne und Kahler aufgestellten Gesichtspunkte haben sich bisher im Wesentlichen als zutreffend erwiesen. Sämmtliche Autoren erkannten die Stellung des Körpers in der Gruppe der Albumosen als richtig an, wenn sie dieselbe auch nicht, wie Kühne und Huppert, mit einer bestimmten Verdauungsalbumose identifizirten. (Die Resultate der chemischen Untersuchungen und die Deutungen der einzelnen Autoren werden weiter unten besprochen.) In allen neueren Fällen, soweit sie zur Autopsie kamen, wurden auch bisher Myelome im Knochenmark gefunden. Askanazy's Beobachtung steht mit den bisherigen nicht in Widerspruch; sie zeigte, dass das Erscheinen des Bence-Jones'schen Körpers nicht ausschliesslich an jene Fälle gebunden ist, in denen die Lymphome circumscript, als Myelome und nur im Knochenmark auftreten; in seinem Falle war es zu einer «lymphadenoiden Degeneration»*)

*) Man kann diese mit Pappenheim,²⁴⁾ der in seiner Arbeit über Lymphaemie vielfach die Anschauungen Neumann's vertritt, als diffus gewordene Lymphome auffassen. — Zwar zeigen die circumscripten Lymphome, die «Myelome», im Gegensatz zu den leukämischen Ver-

des Knochenmarks, zu allgemeiner Lymphomatosis und zu Leukämie gekommen. Da, wo die Section fehlte, wiesen die klinischen Erscheinungen mit Sicherheit auf ein schweres Knochenleiden hin. Nur in dem Fitz'schen Falle bleibt ein solches zweifelhaft. Die spärlichen Notizen (Schmerzen in den Schultern und Steifigkeit in den Gliedern) berechtigen nicht zu weittragenden Schlüssen. Eine Autopsie fand nicht statt. Die Harnalbumose wurde von Fitz zwar nicht eingehend untersucht, zeigte aber doch die wesentlichen und charakteristischen Eigenschaften des Bence-Jones'schen Körpers.

Prof. Naunyn überwies mir im Mai 1898 den Urin der von ihm behandelten Patientin, die an multiplen Knochenaufreibungen*) und «Bence-Jones'scher Albumosurie» litt, zur eingehenderen Verarbeitung, die ich unter Leitung von Prof. Hofmeister durchführte. Die Ergebnisse der Untersuchung und die Deutung, die ich nach denselben dem Bence-Jones'schen Eiweisskörper geben muss, weichen nicht unerheblich von den bisherigen ab, so dass eine genauere Mittheilung der chemischen Untersuchung angezeigt scheint. (Eine ausführliche klinische Mittheilung des Falles hat sich Prof. Naunyn vorbehalten.)

Ich erhielt reichliche Quantitäten des Urins aus verschiedenen Terminen des Krankheitsverlaufes innerhalb achtzehn Monaten durch die Vermittelung des die Patientin behandelnden Arztes, Dr. Koechlin in Mülhausen, dem ich für diese Unterstützung zu bestem Danke verpflichtet bin. Der Urin gelangte in der kalten Jahreszeit ohne Conservierungsmittel, später mit Chloroform oder Thymol versetzt, an das Institut. Er war meist sauer, dunkel gefärbt, nur selten etwas trüb, vom specifischen Gewicht 1021—1026; im Sediment fanden sich zeitweise Gypskrystalle und, übrigens in sparsamer Menge, globulitenartige Ausscheidungen des Eiweisskörpers, wie solche auch von Kühne und Rosin beschrieben sind; von geformten Bestandtheilen gelegentlich Plattenepithelien. Auffallend gering

änderungen des Knochenmarks die Eigenschaft der Bösartigkeit, sie bringen das Knochengewebe zum Schwund; ob man daraus in allgemeinpathologischer Hinsicht prinzipielle Unterschiede herleiten darf, lasse ich unerörtert.

*) Eine Section konnte nicht gemacht werden.

war seine Neigung zur Fäulniss, auch wenn keine gährungs-hemmenden Mittel zugefügt waren.

Der Harn enthielt den Bence-Jones'schen Eiweisskörper in grosser Menge bis zum Tode der Patientin. Seine Menge, bestimmt durch Wägung des Alkoholniederschlags (unter Abzug der Asche) oder durch Ermittlung des Stickstoffgehaltes der Tanninfällung (nach Girgensohn), betrug zu verschiedenen Zeiten 2,4; 2,4; 1,85; 2,0; 2,1; 1,6; 1,85%. Der Gehalt war somit im Anfang etwas höher als später. Die Urinmenge soll nach den Angaben des Arztes in der ersten Zeit gegen $1\frac{1}{2}$, später nur etwa 1 Liter betragen haben; somit wären im Anfang täglich gegen 36 g, später nur 18–20 g des Bence-Jones'schen Körpers zur Ausscheidung gelangt. In der Tagesmenge fanden sich bei zwei Bestimmungen in der ersten Zeit rund 16 g Stickstoff, von denen über ein Drittel (5,6 g) in Form von Eiweiss enthalten war.

Ich beschreibe im Folgenden: 1. die Reactionen des Eiweisskörpers im Urin, 2. die Methoden der Reindarstellung, die Gewinnung in krystallisirtem Zustand und die Eigenschaften des gereinigten Körpers, 3. die Resultate der Pepsinverdauung; ich gebe dann 4. den Vergleich meines Eiweisskörpers mit den von früheren Autoren beschriebenen und 5. die aus den Beobachtungen folgenden Schlüsse über die Natur des Bence-Jones'schen Körpers und seine Stellung im System der Eiweisskörper, 6. Bemerkungen über Herkunft und Bildungsstätte des Körpers.

I. Reactionen des Eiweisskörpers im Urin.

Ich fasse dieselben in folgender tabellarischer Uebersicht zusammen.

Tabelle I.

Reaktionen des Eiweisskörpers im Urin.

1. Erwärmen:	Ausfällung bei 60–65°, theilweise Klärung bei 75–100°. Beim Abkühlen tritt stärkere Trübung auf.
2. Salpetersäure (25%):	Ausfällung in der Kälte. In der Siedehitze theilweise löslich. Beim Abkühlen Verstärkung des Niederschlags.

3. Salzsäure (12 1/2 %):	Wie HNO ₃ .
4. Essigsäure (30 %):	Kein Niederschlag; nach genügendem Zusatz auch nicht in der Wärme.
5. Kohlensäure:	Kein Niederschlag beim Einleiten in den aufs 10fache verdünnten Urin.
6. Neutralisation mit NaOH oder NH ₃ :	Keine Fällung.
7. Neutralisation nach reichlichem Zusatz von NaOH oder Essigsäure:	Reichliches Neutralisationspräcipitat.
8. Millon's Reaction:	Schöne Rothfärbung der Flocken beim Erhitzen.
9. Biuretreaction:	Rothviolettffärbung.
10. Kalilauge und Bleiacetat:	Starke Braunfärbung beim Kochen.
11. Alkohol:	Völlige Ausfällung durch 2 Volumentheile 96 % Alkohols. Der Niederschlag wird nach kürzerer oder längerer Zeit unlöslich.
12. Tannin u. Essigsäure:	Starker Niederschlag, bei 100° nur in Spuren löslich.
13. Pikrinsäure:	Starker Niederschlag, bei 100° nur in Spuren löslich.
14. Essigsäure - Ferrocyankalium:	Geringer Niederschlag, viel stärker im verdünnten Urin; löst sich beim Kochen zum Theil und erscheint beim Erkalten wieder.
15. Kochsalz:	Zusatz von 2 Volumen gesättigter NaCl-Lösung, keine Trübung. Aussalzen mit Steinsalz bei 15—20°: geringe Fällung, in Wasser löslich. Aussalzen mit Steinsalz bei 37°: vollständige Ausfällung; diese ist in H ₂ O nicht mehr löslich.
16. Essigsäure u. concentrirte Kochsalzlösung:	Vollständige Ausfällung.
17. Magnesiumsulfat:	Sättigung bei Zimmertemperatur; keine Fällung.
18. Ammoniumsulfat:	Vollständige Ausfällung bei Zusatz von 2 Volumina gesättigter Ammonsulfatlösung.
19. Dialyse:	Der Körper dialysirt nicht, scheidet sich auch bei tagelangem Dialysiren nicht aus.

Eine Reihe dieser Reactionen erfordert eine eingehendere Beschreibung.

Zu 1. Verhalten beim Erwärmen. Bei langsamen Erwärmen beginnt der Urin sich bei etwa 50° milchig zu trüben, die Trübung nimmt dann zu und zeigt bei etwa 60—65° in einer massenhaften flockigen Ausscheidung ihr Maximum.

Bei höherer Temperatur (70°) beginnt eine deutliche Aufhellung, und beim Siedepunkt ist ein grosser Theil des Niederschlages wieder in Lösung gegangen; doch bleiben nicht unerhebliche Reste des Körpers in groben, sehr zähen Massen ausgeschieden, die leicht an der Gefässwand, sowie am Glasstabe haften und sich wie Fibrinfäden lang ausziehen lassen. Beim Erkalten trübt sich die Flüssigkeit stark, der so entstandene Niederschlag löst sich beim Erhitzen bis zum Sieden wieder nur zum Theil u. s. w. Je öfter man dieses wiederholte, um so geringere Mengen des Eiweisskörpers blieben in der siedenden Flüssigkeit gelöst, und so gelang es auf diese Weise, den Körper successive bis auf die letzte Spur auszuscheiden. Filtrirt man den Urin nach dem erstmaligen Erhitzen auf 100° durch ein auf dieser Temperatur gehaltenes dichtes Filter, so trüben sich beim Erkalten nur die ersten Antheile des Filtrats, während die letzten eiweissfrei sind; die Poren des Papierees verstopfen sich offenbar ziemlich schnell. Eine vollständige Klärung des Urins beim Erhitzen auf 100°, wie sie einzelne frühere Autoren sahen, wurde nie erzielt, auch dann nicht, als der Harn auf das Fünf- und Mehrfache verdünnt wurde. — Bei den aus späteren Zeiten stammenden Urinen wurde der Antheil des beim erstmaligen Erhitzen auf 100° nicht mehr in Lösung gehenden Niederschlags immer grösser, doch konnte zumeist eine theilweise Klärung und eine erneute Trübung beim Abkühlen beobachtet werden, sobald man den Urin in gewöhnlicher Weise auf der Flamme erwärmte.*) — Auf eine einfache Weise aber

*) Urin, der, ein Jahr über Chloroform aufbewahrt, seine saure Reaction bewahrt hatte, zeigte dasselbe Verhalten wie der frische. Nur war die Löslichkeit des Körpers in der Hitze (mit oder ohne Zusatz von Reagentien) noch geringer geworden als früher. Die durch Erwärmen bei 60—65° erzielte dickflockige Ausfällung fängt bei 70° an sich zusammenzuziehen, dann zu schmelzen, bei 86° enthält der völlig geklärte Urin am Boden einen compacten Niederschlag, und nur geringe Eiweissreste bleiben in Lösung.

Eine im October 1899 erhaltene Urinprobe liess weder bei ammoniakalischer Reaction (Zersetzung des Urins), noch auch nach dem Neutralisiren eine deutliche Klärung beim Erhitzen auf 100° erkennen, trotzdem der Harn auch jetzt noch 1 1/2 % des Bence-Jones'schen

gelang es, den Körper quantitativ in der Hitze schon beim erstmaligen Erwärmen auszuschcheiden. Ich verdünnte 10 ccm. Urin mit 40 ccm. Wasser im langhalsigen Kjeldahl-Kolben und erwärmte langsam auf dem Wasserbad; nun schied sich der gesammte Eiweisskörper als zäher Niederschlag, fest an den Wänden haftend, aus und ging auch beim Erhitzen über freier Flamme nicht mehr, selbst nicht in Spuren, in Lösung. Die klare überstehende Flüssigkeit konnte einfach quantitativ abgegossen werden und enthielt auch nicht die mindeste Spur des Eiweisskörpers; der Stickstoffgehalt des an den Glaswänden festklebenden, gut ausgewaschenen Niederschlages stimmte genau mit dem des durch die Tanninfällung im Urin erhaltenen überein. — Je langsamer der Urin erwärmt wird, desto vollständiger ist die Ausfällung bei 100°.

In der ersten Zeit der Untersuchungen musste das soeben geschilderte Verhalten der nur theilweisen Löslichkeit des Körpers bei 100° den Anschein erwecken, als seien im Urin zwei Eiweisskörper*) neben einander vorhanden: ein albumosen-ähnlicher, der, wie bei Kühne u. A., bei 100° vollständig in Lösung ging, und ein zweiter, der nach Art der typischen Eiweisskörper in der Siedehitze völlig coagulierte. Es konnte scheinen, als ob der erste der beiden im Anfang in überwiegender Menge im Urin vorhanden gewesen sei, um später ganz zu verschwinden. Ich muss diese Annahme von vornherein zurückweisen. Erstens zeigte der Urin, sowie der isolirte Eiweisskörper zu allen Zeiten genau das gleiche Verhalten gegenüber der fractionirten Ausfällung mit Ammoniumsulfat (siehe weiter unten); ferner aber gelang es, durch ganz geringe, anscheinend sehr wenig eingreifende Manipulationen (Fällung mit Alkohol, Lösen des Niederschlages in dünnem Ammoniakwasser, Neutralisiren mit Salzsäure) den Körper,

Eiweisskörpers und daneben keinen anderen Eiweisskörper enthielt. Nach Zusatz von etwas Chlorammonium zu dem neutralisirten Urin zeigte dieser jedoch das charakteristische Phänomen der (theilweisen) Klärung bei 100° und der Trübung beim Erkalten sehr schön. S. w. u. S. 213.

*) Matthes, sowie Ellinger fanden ausser dem Bence-Jones'schen Eiweisskörper noch Nucleoalbumin in ihren Fällen.

der im Urin völlig coagulierte, ohne Rest in eine Lösung zu bringen, in der er beim Erhitzen sich zu absoluter Klarheit löste (s. weiter unten S. 212).

Zu 2. 25%ige Salpetersäure bewirkt in der Kälte Ausfällung, die sich im 10fachen Ueberschuss des Fällungsmittels nicht löst, wohl aber, wenigstens theilweise, beim Kochen unter Auftreten der Xanthoproteinreaction. Beim Erkalten kehrt der Niederschlag zurück; beim Neuerwärmen bleibt abermals ein Antheil, und zwar ein grösserer als beim ersten Mal, ungelöst (übrigens in auffallend grobkörniger Structur, die auch sonst öfter beobachtet wurde, aber nie krystallinischer Natur war). Kühne und Süssmann sahen ihren (allerdings nur in geringer Menge auftretenden) Eiweisskörper sich schon in der Kälte in einem Ueberschuss von Salpetersäure auflösen. Bei mir trat dieses Phänomen nie auf, auch nicht bei starker Verdünnung des Urins.

Zu 3. Verdünnte Salzsäure ($12\frac{1}{2}\%$) fällt wie Salpetersäure in der Kälte; die Flüssigkeit klärt sich unter Dunkelfärbung beim Erhitzen theilweise, beim Erkalten erscheint kein oder nur ein sehr spärlicher Niederschlag.

Zu 7. Neutralisation mit Natronlauge nach reichlichem Zusatz von Essigsäure oder umgekehrt ergibt ein massenhaftes Präcipitat; dasselbe fällt noch reichlicher aus, wenn der alkalische oder angesäuerte Harn vor der Neutralisation erhitzt wird (wobei er zunächst klar bleibt); es bleibt aus, wenn nur wenig Alkali oder Säure zum Harn zugesetzt war.

Zu 11. Verhalten gegen Alkohol. Zusatz von 2 Volumina 96%igen Alkohols scheidet den Körper vollständig aus. Der Niederschlag ist nach einigem Stehen leicht abzufiltriren und, sofern gut ausgewaschen, fast rein weiss und mässig aschenhaltig. Bei längerer Berührung mit Alkohol verliert er seine Löslichkeit für Wasser und verdünnte Salzlösungen fast vollständig; ebenso im trockenen Zustand. Eine Reinigung durch wiederholtes Ausfällen mit Alkohol und Wiederauflösen in Wasser gelingt mit Zuhülfenahme einer grossen, schnellwirkenden Centrifuge (s. S. 210).

Zu 15. Kochsalz. Zusatz von 2 Theilen gesättigter

Kochsalzlösung zum neutralisirten Urin gibt keine Fällung. Die Aussalzung mit Steinsalz bewirkt im Urin eine geringe Fällung (jedoch nicht in einer Lösung des gereinigten Körpers). Die bei Zimmertemperatur erhaltene Fällung ist in Wasser löslich, also eine echte Salzfällung. Nimmt man dagegen die Sättigung bei 36° vor, so ist die Ausscheidung der Eiweiss-substanz eine vollständige, aber der Niederschlag geht beim Verdünnen mit Wasser nicht mehr in Lösung. Er ist «coagulirt», indem durch den starken Salzgehalt die Coagulationstemperatur unter die sonst beobachtete Höhe (im Urin ca. 50°) heruntergedrückt worden ist.

Zu 18. Aussalzen mit Ammonsulfat. Zusatz von 2 Volumina gesättigter Ammonsulfatlösung scheidet den Körper quantitativ aus. Der Niederschlag ist in Wasser leicht löslich, sofern die Fällung bei neutraler Reaction stattgefunden hat. Bezüglich der Methodik der Aussalzung von Eiweisskörpern und der Bedeutung dieses Verfahrens für deren Isolirung und Charakterisirung verweise ich auf die Arbeiten von Kauder,¹³⁾ Pohl,¹⁵⁾ Ernst P. Pick.¹⁴⁾

Die untere und obere Fällungsgrenze für meinen Körper lagen in dem neutralisirten Urin bei einem Gehalt von 4,0 bzw. 5,5—6,0 ccm. Ammonsulfatlösung auf 10 ccm. Gesamtvolumen; d. h. die Fällung begann, wenn 10 ccm. der Mischung von Urin, Wasser und gesättigter Ammonsulfatlösung 4,0 ccm., und war beendet, wenn sie 6 ccm. der letzteren Flüssigkeit enthielten. Ausserhalb dieser Grenzen fiel kein eiweissartiger Körper aus. Bei einem Zusatz von 2,8—4 ccm. Ammonsulfatlösung liess der Urin nach längerem Stehen ein relativ reichliches feinkörniges Sediment fallen, das sich ausschliesslich als aus harnsaurem Ammon bestehend erwies.

II. Isolirung und Verhalten des rein dargestellten Körpers. Gewinnung von Krystallen.

Für die Isolirung und Reindarstellung des Körpers wurden zwei Methoden in Anwendung gezogen, die Ausfällung mit Ammonsulfat und die durch Alkohol.

1. *Ausfällung mit Ammonsulfat.*

Durch Ausfällen grösserer Mengen neutralisirten Urins mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung, Auflösen des abfiltrirten, gut ausgewaschenen und scharf abgepressten Niederschlages und mehrfache Wiederholung dieser Proceduren wurden grössere Mengen des Körpers gewonnen. Das bei der ersten Fällung mitgerissene harnsaure Ammon blieb bei der weiteren Umfällung zurück, dagegen wurde stets ein dunkler Farbstoff mitgefällt, der nur durch Filtriren über Thierkohle (allerdings mit grossem Verlust) entfernt werden konnte. Der Eiweisskörper wurde als Niederschlag unter einer zu zwei Dritteln, oder gelöst in einer zu einem Drittel gesättigten Ammonsulfatlösung aufbewahrt.

Zur Anstellung von verschiedenen Reactionen dienten entweder Lösungen des so gereinigten Körpers, die durch tagelanges Dialysiren gegen fliessendes Leitungs-, zuletzt gegen destillirtes Wasser fast salzfrei gemacht waren, oder aber ein Fällungsprodukt, das durch Kochen der noch schwach ammonisulfathaltigen Lösung niedergeschlagen war. Das so coagulirte und gänzlich unlöslich gewordene Präparat wurde mit heissem Wasser erschöpft, doch gelang es trotz wochenlangen Auswaschens nicht, die letzten Reste des Ammonsulfates fortzuschaffen. Andere Aschenbeimengungen enthielt es nur in geringer Menge (P, Ca, Mg, kein Chlor). An diesem Präparat fielen, ebenso wie im Urin, die Schwefelprobe, die Reactionen von Millon, von Molisch und die von Adamkiewicz positiv aus. Bei der Kalischmelze: Indolgeruch und Röthung eines Fichtenspanes. Die Substanz enthält also nicht oxydirten Schwefel, die Tyrosin- und die Indolgruppe, sowie den Kohlenhydratcomplex; letzteren jedoch, nach der Stärke der Reaction zu schliessen, nur in geringer Menge.

Bei der Spaltung mit Salzsäure und Schwefelsäure, die Dr. Spiro anstellte, wurde Leucin neben verhältnissmässig viel Tyrosin und Glutaminsäure gefunden. Eine Untersuchung auf Glykokoll nach Spiro's²⁰⁾ Methode fiel in dessen Händen trotz Verarbeitung relativ grosser Mengen (ca. 30 g) negativ aus. Dieser Befund gewinnt an Interesse dadurch, dass, wie Spiro gezeigt hat, die Heteroalbumose (des Fibrins)

reichlich Glykokoll enthält. Der Nachweis dieser Amidosäure gelang Spiro auch bei verschiedenen Eiweisskörpern, die den Complex der Heteroalbumose enthalten. Letztere Gruppe fehlt aber im Casein und im Bence-Jones'schen Eiweisskörper (s. w. u.) Bei beiden fehlt auch das Glykokoll.

In der dialysirten Lösung fielen die verschiedenen Fällungsreactionen ähnlich aus, wie im Urin. Ein wichtiger Unterschied besteht aber in dem Verhalten gegen Steinsalz. Während die Sättigung mit diesem Salz im neutralisirten Urin bei Zimmertemperatur eine deutliche und erhebliche Trübung bewirkt, bleibt diese in der Lösung des gereinigten Körpers ganz aus.

Einen anderen Unterschied hingegen, den frühere Forscher zwischen dem Verhalten des Urins und dem einer reinen, salzfreien Lösung des Körpers festgestellt hatten, konnte ich nicht constatiren. Mehrere Autoren hatten gefunden, dass der Bence-Jones'sche Körper, durch Dialyse salzfrei gemacht, in der wässerigen Lösung (ohne Zusatz von Salz oder Säure) nicht mehr beim Erwärmen ausfiel. Mir gelang das nicht, selbst als nach tagelangem Dialysiren der eingedampfte Rückstand des Aussenwassers sich als chlorfrei erwies. Stets wurde beim Erwärmen auf ca. 60° ein Niederschlag erzielt.

Der Körper fällt, wie das auch Ellinger für seine Substanz angegeben hat, aus schwach saurer Lösung auf Zusatz von Ammoniak nicht aus. (Reaction auf Histon.) Die Fällungsgrenzen der dialysirten neutralen Lösung für Ammonsulfat liegen bei 4,4 bezw. 6,2 ccm., also um ein Geringes höher als im Urin.

2. Ausfällung mit Alkohol.

Ein anderes Präparat wurde hergestellt durch Ausfällen des Urins mit 2 Theilen Alkohol und Ausschleudern auf einer grossen, elektrisch betriebenen Centrifuge, deren Benutzung mir Prof. Schmiedeberg freundlichst gestattete. Während längere Berührung mit Alkohol den Körper «coagulirt», tritt das bei der kurzen Dauer dieses Verfahrens nicht ein. Bereits nach einer Stunde konnte die klare Flüssigkeit abgehoben und der alkoholdurchtränkte Niederschlag in Wasser suspendirt der

Dialyse ausgesetzt werden. Er löst sich dabei leicht nach einiger Zeit, ohne auch nur in Spuren zu diffundiren. Nach 3—4maligem Wiederholen der Procedur wird der Niederschlag mit kaltem und heissem absoluten Alkohol, dann mit Wasser, wieder mit Alkohol und mit Aether erschöpft und trocken aufbewahrt.

Das Präparat enthält noch reichlich Asche, hauptsächlich Kalk; Magnesia und Phosphorsäure, wohl von vorneherein in Form anorganischer Salze.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergibt in diesem Präparat 15,56 und 15,59% N, berechnet auf die aschenfreie, bei 110° getrocknete Substanz, ebensoviel als Neumeister und Ellinger in ihren Fällen gefunden hatten.

Die Form, in der der Stickstoff innerhalb des Moleküles gebunden ist, wurde nach Hausmann¹⁰⁾ ermittelt. Es waren vorhanden in Form von

Amidstickstoff 1,33% = 8,6% des Gesamt-N,

Diaminostickstoff 3,87% = 24,7% „ „

Monaminostickstoff 10,00% = 64,2% „ „

also gefunden statt

15,57 (bezw. 100%) 15,20% = 97,5% „ „

Die Vertheilung des Stickstoffs ist also eine ähnliche, wie sie Hausmann für das krystallisirte Eieralbumin und das Serumglobulin angibt.

Vollkommen phosphorfrei konnte ich meinen Körper nicht erhalten, auch dann nicht, als ich nach Ellinger's Vorgang die durch Alkoholfällung gewonnene Substanz in heissem Wasser nach Zusatz von etwas Natriumcarbonat löste und die Lösung neutralisirte; eine Fällung von Nucleoalbumin beobachtete ich dabei nicht, auch nicht bei leichter Ansäuerung. Nach mehrfacher Wiederholung der Procedur betrug der P-Gehalt nur noch 0,05%. Es scheint sich darnach um sehr schwer zu entfernende Aschenbeimengungen zu handeln, jedenfalls nicht um ein meinen Körper in geringer Quantität begleitendes Nucleoalbumin. Wenigstens habe ich bei den Verdauungsversuchen nie ein unlösliches Nucleinprodukt auftreten sehen.

Bei längerer Berührung mit Alkohol werden die durch

dieses Fällungsmittel erhaltenen Niederschläge in Wasser ganz oder fast ganz unlöslich. Doch lassen sie sich noch in Lösung bringen, so z. B. durch verdünnte siedende Natriumcarbonatlösung, wie Ellinger angibt, und wie das auch mir leicht gelang. — Noch weniger eingreifend erschien mir folgendes Verfahren, bei dem ich eine überraschende und wichtige Beobachtung machte.

Der neutralisirte Harn wurde mit 2 Theilen Alkohol versetzt, gekocht, der Niederschlag auf dem Filter mit heissem 66^o/oigem Alkohol ausgewaschen und unter $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ oige Ammoniaklösung gebracht. Nach einigen Stunden (beim Erhitzen viel schneller) ist völlige Auflösung eingetreten. Auf Zusatz sehr verdünnter Salzsäure erhält man, wenn die Reaction gerade anfängt neutral zu werden, eine geringe, kaum abzufiltrirende Trübung, beim Ansäuern eine voluminöse, ohne eingreifende Mittel nicht in Lösung zu bringende Fällung. Wichtig ist das Verhalten der genau neutralisirten, etwa 1—2 Procent Chlorammonium enthaltenden Lösung. Diese gibt, wie der native Urin, beim Erwärmen eine sehr starke Ausfällung, die sich aber zum Unterschied von dem Urin in der Siedehitze zu absoluter Klarheit löst. Beim Erkalten erscheint der Niederschlag wieder. In dieser Flüssigkeit kann Ausfällung und Wiederauflösen beliebig oft wiederholt werden, ohne dass auch nur Spuren bei 100° ungelöst bleiben.

Da die gewöhnlich im Harn auftretenden Eiweisskörper nach Alkoholcoagulation sich nicht in verdünntem Ammoniak auflösen, so kann eine Beimengung von solchen jedenfalls nicht vorhanden gewesen sein.

Die wesentliche Bedeutung des Versuches liegt aber in anderer Richtung.

Es ist nämlich gelungen, den Körper, der sich im Urin unter Umständen durch Kochen in der Siedehitze vollständig ausfällen liess, in eine Lösung überzuführen, in der er sich (genau wie im Urin des Kühne'schen Falles) beim Sieden wasserklar und restlos löste.

Dieser Versuch zeigt auf das Schlagendste, dass die Verschiedenheiten in dem Verhalten des Körpers bei 100° nur abhängig sind von den Eigenschaften des lösenden Mediums.

Entfernung der anderen Harnbestandtheile und Zusatz von Chlorammon lässt die Löslichkeit bei 100° auf das Schönste hervortreten. Aber auch ohne Entfernung der im Urin enthaltenen Stoffe, d. h. im Urin selbst bewirkt ein Zusatz von Salmiak ein deutlicheres Hervortreten der für unseren Körper charakteristischen Reaction.

Man erhält also aus dem Alkoholcoagulat den Körper durch NH_3 oder NaHCO_3 mit nachfolgender Neutralisation von Neuem in einer Lösung, in der er seine hervorstechendste Eigenschaft wieder zeigt. Ob er ganz unverändert ist, lässt sich bezweifeln. Wenigstens ist das Verhalten gegen Ammonsulfat ein anderes, die Fällungsgrenzen liegen niedriger, so für ein durch Ammoniak in Lösung gebrachtes Präparat bei (2,5 bezw. 6,0 ccm.) Ammonsulfatlösung; für ein solches, das mit NaHCO_3 behandelt und dann neutralisirt war, bei 0,6 bezw. 2,2 ccm. Die Fällungsgrenze erwies sich hier als nicht ganz constant.

Inzwischen hat Spiro (s. d. vorangehende Publication) die Entdeckung gemacht, dass auch die gewöhnlichen echten Eiweissstoffe ihre Gerinnbarkeit bei 100° und die Fällbarkeit durch Alkohol auf Zusatz von Harnstoff leicht einbüssen, ja dass coagulirtes Eiweiss durch Harnstofflösung verflüssigt wird.

Im Anschluss an diese Entdeckung habe ich auch den Einfluss von Harnstoff und einigen Salzen auf meinen Körper studirt. Benutzt wurden einerseits neutraler Urin mit ca. 2% des Bence-Jones'schen Körpers, ein desgleichen schwach alkalischer und eine ca. 2% enthaltene salzfrei dialysirte Lösung des Bence-Jones'schen Körpers (durch Ammonsulfatfällung gewonnen). Untersucht wurde der Einfluss von Harnstoff, Kochsalz, Salmiak, Chlormagnesium in concentrirten Lösungen von bekannter Stärke, sowie von 2 verschiedenen Mischungen von Monokaliumphosphat mit Dinatriumphosphat, von denen die eine stark alkalisch, die andere stark sauer war.

Allemaal wurden zu 2 ccm. der Lösung des Bence-Jones'schen Körpers verschiedene Mengen des Harnstoffs resp. der Salzlösungen hinzugefügt und dann mit destillirtem Wasser auf 4 ccm. aufgefüllt.

Das summarische Ergebniss der Versuche ist folgendes:

Ein Unterschied zwischen den drei verschiedenen Lösungen des Bence-Jones'schen Körpers war nicht vorhanden. Von den angeführten Salzen lässt nur das Chlorammonium die Löslichkeit des Bence-Jones'schen Körpers bei 100° stärker hervortreten, und zwar gibt es ein Optimum für den Zusatz des Salmiaks; die anderen Salze erweisen sich als wirkungslos; auch beim Zusatz von Salmiak wird eine absolute Klärung bei 100° nicht erzielt, es bleibt eine feine Trübung bestehen. Ausserordentlich viel stärker ist der Einfluss des Harnstoffs; es gelingt bei einem grossen Zusatz von Harnstoff, eine bei 100° klare Lösung zu erzielen; andererseits fallen bei solchem Zusatz beim Erwärmen nur mehr wenig Flocken aus; steigert man den Harnstoffgehalt noch um ein Geringes, so gibt die Lösung bei keiner Temperatur einen Niederschlag, auch nicht beim Wiederabkühlen.

Die folgende Tabelle illustriert diese Angaben über die Wirkung des Harnstoffs:

Harn	50% Harn- stoff- lösung	H ₂ O	Die Mischung enthält an zu- gesetztem Harnstoff	Beim Erwärmen	Bei 100°	Bei Abkühlung	Wieder- holtes Er- wärmen. Ab- kühlen
2 ccm.	0	2,0 ccm.		starke Fällung	trübe, viel grobe Eiweisscoagula	Trübung nimmt zu ¹⁾	Genau wie beim erstmaligen Erwärmen
„	0,2	1,8 „	2,5 %	„ „	weniger trübe, kein Eiweisscoagulum	„ „ „	
„	0,4	1,6 „	5,0 %	„ „	fast klar	starke Fällung	
„	0,5	1,5 „	6,25 %	geringere Fällung	absolut klar	„ „	
„	0,6	1,4 „	7,5 %	starke Trübung	absolut klar	„ Trübung	
„	0,7	1,3 „	8,7 %	minimale schnell verschwindende Trübung	„ „	keine Fällung, bleibt klar ²⁾	
„	0,8	1,2 „	10,0 %	bleibt klar	„ „	„ „	
„	1,0	1,0 „	12,5 %	„ „	„ „	„ „	
„	1,5	0,5 „	18,8 %	„ „	„ „	„ „	
„	2,0	0,0 „	25,0 %	„ „	„ „	„ „	

¹⁾ Zusatz von Harnstofflösung bringt in der Kälte die Coagula leicht in Lösung.

²⁾ Zusatz von H₂O bewirkt deutliche Trübung, die beim Erwärmen stark zunimmt.

Der Zusatz von Harnstoff macht den Körper an sich nicht ungerinnbar. Verdünnt man eine solche mit Harnstoff versetzte beim Kochen und beim Abkühlen klar gebliebene Lösung mit Wasser, so tritt nunmehr schon in der Kälte ein Niederschlag auf, der sich bei 50° verstärkt.

Niederschläge des Bence-Jones'schen Körpers, die durch Erhitzen und Wiederabkühlen gewonnen sind, gehen in mässig starker Harnstofflösung schon in der Kälte leicht in Lösung.*) Zusatz von Harnstoff zum Urin erschwert die Ausfällung des Eiweisskörpers durch Alkohol (und andere Reagentien). In einer 12 1/2 Procent Harnstoff enthaltenden Lösung sind (statt sonst zwei) 4 1/2 Volumen Alkohol zur vollständigen Ausfällung nöthig.

Im Anschluss an diese Versuche wurde noch der Einfluss der ebengenannten Zusätze auf die Ausscheidungstemperatur des Eiweisskörpers untersucht und zwar für Harnstoff, Kochsalz und Salmiak. Scharf beobachten liess sich hierbei nur das Eintreten der ersten Trübung, sowie der Zeitpunkt, bei dem das Maximum der Klärung erreicht wird. (Die Momente der beginnenden Flockenbildung, der maximalen Trübung, der beginnenden Aufhellung lassen sich auch bei gleichzeitiger Anstellung der verschiedenen Versuche nicht genügend scharf angeben.) Ein Einfluss des zugesetzten Salmiaks auf die Temperatur, bei der die erste Trübung erreicht wird, war nicht nachweisbar. Steigender Kochsalzzusatz erhöhte die Fällungstemperatur um ein Geringes (von 54 auf 56°); erst bei sehr starkem Kochsalzgehalt tritt eine Herabsetzung ein, so dass eine mit Salz gesättigte Lösung bei 46° die erste Ausscheidung zeigt; lässt man bei 37° im Brutofen die gesättigte Lösung einige Stunden stehen, so tritt eine vollständige Coagulation schon bei dieser Temperatur ein. Steigender Harnstoffzusatz erniedrigt den Trübungspunkt (von 53,5 auf 52,5°).

*) Auch diese schon einmal unlöslich gewesenen Lösungen zeigen ähnlich wie die wieder in Lösung gebrachten Alkoholfällungen (s. S. 213) eine Verschiebung der Fällungsgrenzen durch Ammoniumsulfat nach unten.

2 ccm.	2,0	2,0	1,0	2,0		Urin		
0 >	0,2	0,4	0,7	0,8	1,0 ccm.	50% Harnstofflösung		
2 >	1,8	1,6	1,3	1,2	1,0 >	Aqua dest.		
53,5	52,5	52,5	52,5	57,0	bleibt aus	erste Trübung		
58	53,5	53,5	57,0	bleibt aus	> >	dichte >		
59	56	56	63	> >	> >	Flockenbildung unter Klärung		
67	62	58	63	63	> >	Aufhellung		
85	76	72	71	71	—	Maximum der Klärung erreicht		
viel Coagula in geschmolzenem Zustand	wenig Coagula		ganz klar			bei 100°		
geringe Trübung		deutliche Trübung	minimale Trübung	bleibt klar		bei Abkühlung.		
Harn	2ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	2 ccm.	1 ccm.	4 ccm mit Steinsalz gesättigt
20% NaCl-Lösung	0 >	0,2 >	0,4 >	0,8 >	1,2 >	1,6 >	3,0 >	
Aqua dest.	2 >	1,8 >	1,6 >	1,2 >	0,8 >	0,4 >	—	
Erste Trübung	54,0	54,5	55,0	55,0	55,5	56,0	56,5	46,0°

Gewinnung von Krystallen.

Versuche, solche nach Hofmeister's Methode durch freiwillige Verdunstung einer ammoniumsulfathaltigen Lösung des Bence-Jones'schen Körpers zu erhalten, schlugen trotz Anwendung der verschiedensten Kunstgriffe zunächst fehl. Es wurden nur schöne grosse Globuliten erhalten. Erst als eine Lösung des Körpers, die etwas weniger als 40 Volumprocente gesättigter Ammonsulfatlösung enthielt (bei welchem Gehalt die untere Fällungsgrenze noch nicht erreicht ist), in verschlossener Flasche bei Zimmertemperatur fortgestellt war, zeigten sich nach Ablauf von vier Monaten millimetergrosse, glitzernde Krystalle in Drusen an den Wänden der Flasche ausgeschieden. Ihre Menge vermehrte sich, als die Flüssigkeit nun einer äusserst langsamen Verdunstung ausgesetzt wurde. Nach weiteren drei Monaten stand eine etwas grössere

Menge von schön ausgebildeten Krystallen, gemischt mit weniger schönen Exemplaren und mit Globuliten, zur Verfügung. Sie wurden abfiltrirt, scharf abgepresst, in Wasser gelöst und mit Ammonsulfatlösung bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 24 Stunden war ein grosser Theil des Eiweisskörpers krystallinisch ausgeschieden, und der noch in Lösung verbliebene Antheil konnte durch weiteren Zusatz von Ammonsulfat krystallisirt erhalten werden. Auf diesem Wege wurde der Körper noch mehrfach umkrystallisirt; er fiel dabei sofort krystallisirt aus. Makroskopische Krystalle wurden nie wieder erhalten. — Leider musste ich mich auf diese aus jener einen Flasche erhaltene Ausbeute beschränken. Trotz Wiederholung der Versuche unter den gleichen äusseren Bedingungen, trotz Impfung mit den vorhandenen Krystallen, trotz aller erdenklichen Variationen, die durch ein ganzes Jahr fortgeführt wurden, gelang es nicht, weitere Krystalle zu gewinnen. Die Ausbeute war gering, ca. 1 g.

Die Krystalle zeigten die Gestalt schöner Rhomboeder, etwa der Kalkspatrhomboeder; sie erwiesen sich im Gegensatz zu den Globuliten als doppelbrechend, in Uebereinstimmung mit allen anderen bisher auf gleichem Wege erhaltenen Eiweisskrystallen.

Bei der geringen Menge des Materials konnte ich nur die hauptsächlichsten Eigenschaften der Krystalle prüfen.

Die unter einer ammonsulfathaltigen Lösung aufbewahrten Krystalle lösten sich nach dem Filtriren und Abpressen etwas langsamer in Wasser als der unkrystallisirte Körper, immerhin genügend leicht. Die wässerige Lösung wurde beim Erwärmen stark getrübt, bei 100° wurde sie bei noch vorhandenem geringen Salzgehalt klar, während nach starker Dialyse, wenn das Ammonsulfat bis auf Spuren entfernt war, in der Siedehitze Klärung nicht eintrat. Die Fällungsgrenzen durch Ammonsulfat lagen für die salzfreie, sehr stark verdünnte Lösung des Bence-Jones'schen Körpers bei 4,8 resp. 6,6 ccm. Ammonsulfatlösung, also etwas höher als im Urin.

Gegen Salpetersäure, Kochsalz, Kochsalzessigsäure, Ferrocyanalkaliumessigsäure reagierte die Lösung des krystallisirten Körpers genau wie die des nicht krystallisirten.

Die Krystalle waren noch nicht aschefrei: Bei der Salpeterschmelze ergaben sie (durch Molybdänsäure- und Tripelphosphatniederschlag nachgewiesen) einen geringen Phosphorgehalt. Da die direkte Veraschung im Platintiegel aber eine nicht saure, sondern eine in Wasser unlösliche, in Salzsäure lösliche Asche lieferte, so darf auch hier der Phosphorgehalt wohl auf eine Beimengung von Kalk und Magnesiaphosphat bezogen werden.

In letzter Zeit ist es gelungen, durch geeignete Vorbehandlung (mit ammoniakalischer Magnesialösung) die Phosphate zu entfernen und ganz phosphorfreie Präparate zu erhalten. (Zur Verbrennung gelangten zweimal Proben von mehr als 1 g des Bence-Jones'schen Körpers [Alkoholfällung].)

Bisher sind nur wenige dem Thierreiche entstammende Eiweisskörper krystallisirt erhalten worden; vor vielen Jahrzehnten schon die Hämoglobine verschiedener Thierarten, die ohne Zusatz von Salzen krystallisiren. Aus salzhaltiger Lösung krystallisiren das Eieralbumin (Hofmeister²¹), das Serumalbumin des Pferdes, des Kaninchens (Gürber²²), des Meerschweinchens (S. Gruzewska²⁶) und der Bence-Jones'sche Körper. Moraczewski's²³) Angabe, dass er Casein und Vitellin in Verbindung mit Phosphaten zur Krystallisation gebracht habe, hat noch keine Bestätigung gefunden.

Der Bence-Jones'sche Körper ist, vom Hämoglobin abgesehen, der erste dem menschlichen Organismus entstammende Eiweisskörper, dessen Krystallisation im Glase des Chemikers gelungen ist. Zwar ist noch ein anderer krystallisirter Eiweissstoff gleicher Abstammung bekannt; aber dieser gelangte bereits in krystallisirtem Zustand dem Chemiker in die Hände: es ist dies der von Noël Paton¹⁸) im Harn eines (an einer unbekannten Krankheit leidenden) Mannes aufgefundene Eiweisskörper. Dieser, offenbar ein Globulin, fand sich im Harn in kolossaler Menge vor, zum Theil gelöst, zum Theil in centimeterlangen, prachtvoll ausgebildeten Nadeln. Der im Harn gelöste Antheil schied sich bei der Dialyse gleichfalls in Krystallen aus. — Dieser Körper ist seither noch nicht wieder gefunden worden.

Es ist interessant, dass die beiden einzigen aus dem

menschlichen Stoffwechsel herrührenden Eiweisskörper, die man in krystallisirtem Zustand kennt, pathologische Produkte sind, und dass sie im Harn vorkommen.

III. Verhalten bei der Pepsinverdauung.

Die bisher angeführten Versuche hatten die Vermuthung wachgerufen, dass es sich bei unserem Körper nicht um eine albumosenähnliche Substanz handle, sondern dass sie vielmehr den genuinen Eiweisskörpern nahe stehe; Verdauungsversuche mit Pepsin konnten unter Umständen Aufklärung liefern. Wir haben uns zur Trennung der Albumosen ausschliesslich der Hofmeister'schen Methode, wie sie von E. P. Pick¹⁴⁾ eingeführt wurde, bedient. Unter den Verdauungsprodukten kann man zur Zeit mindestens zwei primäre (Proto- und Heteroalbumose), sowie mindestens drei «secundäre Albumosen A, B, C» unterscheiden und von einander trennen, und weiterhin zwei «Peptone» isoliren.

Aus dem Verdauungsgemisch des Bence-Jones'schen Körpers konnte ich eine durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbare Albumose isoliren, die sich nach ihrer relativen Löslichkeit in Alkohol und nach ihren sonstigen Reactionen als Protoalbumose erwies, dann drei durch grösseren Ammonsulfatzusatz fällbare Albumosen und zwei Peptone; diese Körper zeigten im Wesentlichen ähnliche Eigenschaften, wie die entsprechenden Produkte aus Fibrin, Albumin, Globulin u. s. w. Eine Substanz vom Verhalten der Heteroalbumose fand sich nicht. — Ebensowenig gelang der Nachweis eines unlöslichen Nucleins im Verdauungsgemisch.

Der Verdauung wurden nach orientierenden Vorversuchen ca. 40 g einer drei- bis viermal mittelst Ammonsulfat «umgefällten» Substanz unterworfen, die zum Schluss durch 24stündige Dialyse vom grössten Theile des Salzes befreit worden war. Als Pepsin diente das beste Grübler'sche Präparat. Nach spätestens 2—3stündiger Verdauung war der ursprüngliche Körper ganz verschwunden und liessen sich schon sämmtliche überhaupt erhältliche Fractionen, inclusive der Peptone, nachweisen; nach 6—10 Stunden waren noch reichlich «primäre», d. h. durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbare Albumosen vorhanden, nach 30 Stunden nur spärliche Reste derselben. Nach einer Verdauung von 8 Tagen waren sie nicht mehr nachweisbar; es fanden sich nur wenig «secundäre

Albumose A>, reichlich dagegen die anderen Fractionen vor. — Bei der Neutralisation der Verdauungsflüssigkeiten wurde ein Präcipitat nie erhalten; doch schieden sich beim Eindampfen des neutralisirten Verdauungsgemisches auf etwa ein Fünftel Flocken (von Acidalbumin?) aus, deren Menge zur Untersuchung nicht ausreichte. — Bei der Trennung der einzelnen Fractionen verfuhr ich genau wie Pick, Alexander¹⁷⁾, Umber¹⁸⁾ u. s. w., auf deren Arbeiten ich verweise.

Die untere und obere Fällungsgrenze der ersten Fraction (primäre Albumosen) lagen bei 3,2 bzw. 4,8 (bei einem zweiten Versuche bei 2,8 bzw. 4,8), die für die zweite Fraction (secundäre Albumose A) bei 5,6 bzw. 7,2, für die dritte (secundäre Albumose B) bei 7,8 bzw. 9,2 ccm. Die vierte (secundäre Albumose C) fiel am besten aus beim Zusatz von $\frac{1}{10}$ Volumen schwefelsäurehaltiger Ammonsulfatlösung zu der ammoniumsulfatgesättigten Auflösung; die beiden Peptone wurden, wie bei Pick und Umber, durch Fällung mit Jodjodkalium gewonnen und dann durch Alkohol getrennt, dann gereinigt. Ein Vergleich dieser Fällungsgrenzen mit denen der Verdauungsprodukte des Fibrins, Eialbumins, Serumalbumins und Serumglobulins (cf. deren Zusammenstellung bei Umber) zeigt eine Aehnlichkeit des Verhaltens unseres Körpers mit dem Globulin. Während die Fällungsgrenzen für die secundäre Albumose A bei den übrigen obengenannten Körpern bei 5,4 bzw. 6,2 ccm. liegen, sind sie beim Serumglobulin und dem Bence-Jones'schen Körper erheblich höher (5,6 bzw. 7,2 ccm.). Die Gesamtausbeuten waren, wie bei den früheren Autoren, im Vergleich zu der Menge des Ausgangsmaterials gering, immerhin zur Anstellung aller Reactionen ausreichend. In sehr spärlicher Menge war nur die secundäre Albumose C vorhanden.

Aus der ersten Fraction der «primären Albumose», war eine Heteroalbumose nicht abzuschcheiden, weder bei der Dialyse (Kühne), noch auch nach Zusatz von einem halben und einem ganzen Volumen Alkohol zur wässerigen Auflösung und mehrstündigem Kochen des Gemisches am Rückflusskühler (E. P. Pick). Nach letzterer Methode war im Hofmeister'schen Laboratorium aus den beiden sogenannten «primären Albumosen» bei sämmtlichen bisher untersuchten Körpern, mit Ausnahme des Caseins, eine Heteroalbumose isolirt worden. Nur bei letzterem Produkte und bei unserem Körper fehlte sie.

Die folgende Tabelle gibt eine Uebersicht der Fällungsgrenzen und der hauptsächlichsten Reactionen unseres Körpers und seiner Verdauungsprodukte. Die letzteren verhalten sich im Allgemeinen ähnlich wie die Pepsinspaltungsprodukte aus anderen Eiweisskörpern, soweit sie bis damals in Hofmeister's Laboratorium untersucht waren; einige Abweichungen (Auftreten der Millon'schen Probe beim Pepton B, die Schwäche der Molisch'schen Reaction bei den secundären Albumosen A, B u. s. w.) machen eine erneute Untersuchung wünschenswerth. Sie sind zum Theil vermuthlich von der noch nicht weit genug durchgeführten Trennung und Reinigung der einzelnen Fractionen abhängig.

Tabelle II.
Reactionen des Bence-Jones-Körpers und seiner Verdauungsprodukte.

	Schwefelprobe	Millon's Reagens	Biuret-Probe	Molisch's Probe	Adamkiewicz's Probe	Aussalzen mit Steinsalz	Steinsalz und Essigsäure	Verdünte Kupfersulfatlösung
1. Bence-Jones-Körper	starke Schwärzung	intensiv	violettroth	schwach, aber deutlich	sehr schön	keine Fällung	vollständige Ausfällung	starke Fällung
2. Protalbumose	starke Schwärzung	stark roth	rein roth	viel stärker als bei 1	schwach	Fällung	Fällung stärker als bei Steinsalz allein	starke Fällung
3. Secund. Albumose A	Braunfärbung	stärker als bei 2	violettroth	minimal (?)	schwach	starke Fällung	Steinsalz allein	keine Fällung
4. " B	"	wie bei 2	roth	minimal (?)	etwas schwächer	keine Fällung	unvollständige Fällung	"
5. " C	negativ	sehr schwach	blauviolett	deutlich	minimal	"	keine Fällung	"
6. Pepton A alkoholunlöslich	"	sehr schwach	purpurfarben	negativ	negativ	"	"	"
7. Pepton B alkohollöslich	"	deutlich	rein roth	"	"	"	"	"

IV. Zusammenfassung und Vergleich mit den Angaben früherer Autoren.

Ich habe im Urin meines Falles nur einen einzigen Eiweisskörper nachweisen können. Die Abwesenheit von Albumin und Globulin liess sich durch das abweichende Verhalten gegen Ammonsulfat*) ausschliessen, die des letztgenannten Eiweisses auch noch durch das Verhalten des Harns gegen Magnesiumsulfat und bei Einleiten von Kohlensäure sowie bei der Dialyse. Vor Allem spricht gegen die Anwesenheit eines der gewöhnlichen coagulablen Eiweisskörper der Umstand, dass der durch Alkohol erhaltene unlöslich gewordene Niederschlag sich restlos in verdünntem NH_3 löste, und diese Lösung nach Neutralisation wieder das Verhalten des ursprünglichen Körpers, d. h. völlige Löslichkeit bei 100 °, zeigte. — Nucleoalbumin, von Matthes und Ellinger gefunden, schien nicht beigemengt zu sein. Auch die Anfangs sich aufdrängende Möglichkeit, dass zwei von den gewöhnlichen abweichende Eiweisskörper in dem Urin vorhanden seien, hat sich als unrichtig erwiesen.

Der von mir untersuchte Bence-Jones'sche Körper steht den von früheren Forschern studierten jedenfalls nahe. Bezeichnen diese ihn aber durchgängig als eine mit den Verdauungsalbumosen identische oder ihnen nahestehende «Albumose», so kann ich für meinen Körper dieser Auffassung nicht beipflichten.

Die Beschreibung, die die bisherigen Autoren von dem Bence-Jones'schen Eiweisskörper geben, geht in recht vielen Punkten auseinander; auch mein Fall zeigt seine Besonderheiten. Die Frage drängt sich auf: Umfasst der Begriff «Bence-Jones'scher Eiweisskörper» eine Gruppe von Substanzen, und haben die Untersucher verschiedene Körper in Händen gehabt, oder handelt es sich um einen einheitlichen Körper, bei dem nur unwesentliche Verschieden-

*) Serumglobulin beginnt bei einem Gehalt von 33 Volumprocenten Ammonsulfatlösung auszufallen, Serumalbumin bei einem solchen von 66. Das Eiweiss des Harns dagegen fiel zwischen 40 und 60 Volumprocenten aus.

heiten der Untersuchungsmethoden und -Bedingungen zu verschiedenen Resultaten und divergierenden Auffassungen geführt haben ?

Zur Entscheidung dieser Alternative ist ein genauer kritischer Vergleich der bisherigen Angaben und ein Hervorheben der Verschiedenheiten nicht zu umgehen.

Eingehendere chemische Untersuchungen liegen vor von Bence-Jones, Kühne, Huppert, Zeehuysen-Stockvis, Matthes, Rosin (Süssmann) und Ellinger.

Ein Vergleich unseres Körpers mit den von diesen Autoren beschriebenen ist freilich nicht in sämtlichen Punkten gleichmässig durchführbar, weil die einzelnen Forscher nicht alle Eigenschaften gleichmässig berücksichtigt und studirt haben; weil ferner manche Reactionen mit dem Urin, andere hingegen mit der Lösung der reinen Substanz angestellt worden sind; auch die Isolirung und Reindarstellung ist nach verschiedenen Methoden erfolgt. Nichtsdestoweniger lässt sich ein Vergleich zum Mindesten für eine Reihe der wichtigeren Reactionen durchführen, für welche scheinbare oder thatsächliche Differenzen in den Angaben vorliegen.

1. Die Coagulationstemperatur wird von den einzelnen Autoren verschieden angegeben und schwankte auch im einzelnen Fall. Die erste Trübung trat beim Erwärmen des Urins für gewöhnlich innerhalb der Grenzen von 50 bis 58° auf; in stark salzhaltigen Lösungen lag die Coagulationstemperatur meist tiefer, doch betonen die meisten Autoren (Kühne, Matthes, Ribbink, Ellinger), dass sie abhängig sei von Salz- und Säuregehalt. Das trifft auch für meinen Körper zu: im Allgemeinen sinkt (von einer gewissen Concentration an) [Pauli²⁶⁾] mit zunehmendem Salzgehalt die Coagulationstemperatur.

2. Vollständigkeit der Lösung des Körpers bei 100°. Auch hier liegen Differenzen in den Befunden vor. Bei Kühne sowohl wie bei Matthes war der Körper bei 100° im Urin vollständig gelöst, ebenso bei Ellinger. Die in der Siedehitze bei letzterem Autor noch vorhandene Trübung rührte von Nucleoalbumin her; bei Ribbink und Huppert, sowie

(des durch Dialyse gereinigten Körpers), die beim Erwärmen coagulierte und beim Erhitzen auch nicht die mindeste Lösung des Niederschlages zeigte! (Zeitschr. f. Biologie, Bd. 20, S. 42). Ebenso werden Differenzen beobachtet in dem Verhalten einer salzfreien, durch Dialyse gewonnenen Lösung. Kühne, Ribbink, Matthes, Ellinger fanden, dass eine solche Lösung beim Erwärmen keine Fällung gibt;*) sie that es erst nach Zusatz von Säure oder Salz. In unserem Fall war auch ohne solchen Zusatz eine Ausfällung bei mittleren Wärmegraden stets zu erzielen.

Trotzdem also die Löslichkeit des Bence-Jones'schen Eiweisskörpers bei 100° eine recht wichtige Eigenschaft ist, trotzdem gerade sie, und nur sie, wenigstens bisher, zur Auffindung des Körpers im Urin geführt hat, ist sie doch keine wesentliche, immanente Eigenschaft: Das verschiedene Verhalten in den einzelnen Fällen nach dieser Richtung hin erlaubt nicht, eine Verschiedenheit dieser Körper zu statuieren.

3. Das Verhalten des Körpers gegen Sättigung seiner Lösungen mit Steinsalz. Die hier bei den Autoren zu Tage tretenden scheinbaren Differenzen finden ihre Erklärung darin, dass die Auflösung des Körpers im Harn sich eben anders verhält, als eine solche in neutraler Salzlösung. Ribbink findet beim Aussalzen mittelst Steinsalz im Harn weder bei 15° noch bei 40° eine Ausfällung, selbst nicht nach Tagen. Matthes constatirte nach mehreren Tagen im Harn eine Trübung; doch findet in der Lösung des reinen Körpers in Matthes' Fall nach Neumeister keine Fällung statt. Ellinger sah nach Zugabe einer gesättigten Kochsalzlösung eine allmähliche, unvollständige Fällung, Kühne beim gleichen Verfahren nur eine Trübung. Auch ich fand in dem sauren Urin durch Sättigen bei gewöhnlicher Temperatur eine unvollständige Ausfällung, in der Lösung des reinen Körpers keine Trübung. Genau das Gleiche gibt Süßmann an. Im Gegensatz zu diesen Angaben konnte Huppert seinen Körper

*) Kühne constatirte freilich, dass die Lösung alkalisch reagirte.

durch Kochsalz bei 35 bis 40° vollständig aussalzen, aber diese Aussalzung ist, wie Zeehuysen richtig vermuthet, keine reine Aussalzung, bei welcher der Körper nach Entfernung des Salzes wieder in Lösung geht, sondern eine Coagulation, die in Folge des hohen Salzgehaltes schon bei niederer Temperatur stattfindet. Auch unser Körper liess sich im Thermostaten bei 37° durch Kochsalz völlig abscheiden; dieser Niederschlag war coagulirt und in kaltem Wasser nicht mehr löslich, im Gegensatz zur echten Aussalzung durch Ammoniumsulfat; letztere, bei Zimmertemperatur und neutraler Reaction vorgenommen, ergab bei beliebig oft vorgenommener Wiederholung stets einen in Wasser löslichen Niederschlag. Auch im Verhalten zum Kochsalz bestehen somit keine wesentlichen Verschiedenheiten; eine neutrale Lösung des gereinigten Körpers ist durch Kochsalz bei Zimmertemperatur überhaupt nicht fällbar (Unterschied von der Proto- und Heteroalbumose).

4. Dialyse. Kühne und Matthes geben an, dass ihr Körper auch nicht in Spuren dialysire; das Gleiche trifft für den unseren zu. Ellinger hat seinen Körper durch Dialyse gereinigt, ohne freilich ausdrücklich zu bemerken, dass sein Körper gar nicht dialysabel sei. Nur Ribbink sah einen Theil durch künstliches Pergament hindurchgehen; doch liegt wohl die Möglichkeit vor, dass sein Pergament nicht vollkommen dicht gewesen sei, da sein Körper sonst ja mit den anderen im Wesentlichen übereinstimmte.

5. Verdauung mit künstlichem Magensaft. Dieselbe ist von Kühne, Matthes, Ribbink und von mir untersucht worden. Differenzen in den einschlägigen Angaben bestehen nicht so sehr in den nur von Matthes aufgefundenen Verdauungsprodukten eines Nucleins (denn dieses rührte wahrscheinlich, wie Neumeister angibt, und wie auch Matthes laut mündlicher Mittheilung nunmehr annimmt, von einem neben dem Bence-Jones'schen Körper im Urin vorhandenen Nucleoalbumin her), sondern vielmehr in dem Auffinden verschiedener Verdauungsprodukte seitens der einzelnen Forscher. Ich konnte eine Protalbumose, drei sogenannte

secundäre Albumosen, zwei Peptone nachweisen, isoliren und sie durch Prüfung ihrer Eigenschaften identificiren. Matthes und Ribbink geben nur an, dass der Körper sehr leicht und vollständig bei der Verdauung gelöst werde; der Erstere findet schon nach zehn Minuten Deuteroalbumosen und Pepton, der Andere gibt an, dass sein Körper zum grössten Theil in Pepton umgewandelt sei. Ausdrückliche Angaben über An- oder Abwesenheit primärer Albumosen fehlen. Kühne gibt an, dass nach 1—2 Stunden langer Verdauung seines Eiweisskörpers nur noch Pepton in der Lösung vorhanden gewesen sei; weder mit Salpetersäure, noch mit Essigsäure und Kochsalz erhielt er Niederschläge, so dass Körper, die unserer Protalbumose, unseren secundären Albumosen A und B gleichen, bei ihm gefehlt zu haben scheinen. Dieser Unterschied meinem Befund gegenüber ist wohl nur ein scheinbarer, denn da der Bence-Jones'sche Körper leicht verdaut wird, so kann ein Uebersehen der ersten Verdauungsprodukte zu jener Zeit um so leichter erfolgt sein, als ja schärfere Methoden der Trennung und Darstellung erst im Laufe der letzten Jahre bekannt geworden sind.

6. Albumosatbildung. Kühne versteht darunter eine Veränderung der Bence-Jones'schen «Albumose» durch Zusatz starker Laugen analog der Albuminatbildung. Um etwas Aehnliches handelt es sich bei der Acidalbuminbildung durch Mineralsäuren. In beiden Fällen werden die Körper verändert, so dass sie bei Neutralisation aus der Lösung niedergeschlagen werden. Die einzelnen Eiweisskörper verhalten sich dabei verschieden; die gereinigten Verdauungsalbumosen zeigen diese Eigenschaft nicht.

Kühne, Matthes, Ellinger und Süssmann geben übereinstimmend an, dass durch Neutralisation des angesäuerten oder mit Alkali versetzten Harnes der Körper unlöslich ausfalle. Ich kann das nur bestätigen. Namentlich Kühne legt, worauf ich noch zurückkomme, auf diesen Vorgang grosses Gewicht. Bei Huppert finden sich keine Angaben. Nur Ribbink konnte ein solches Neutralisations-

präcipitat nicht erzielen. Das lag vielleicht daran, dass er nicht genug Säure oder Alkali zum Harn zugesetzt hatte; in diesem Falle bleibt eben die sonst stets eintretende Fällung bei der Neutralisation aus (s. o. S. 207). Ebenso ist eine andere Differenz in den Angaben der Autoren aufklärbar: Löst man eine «coagulierte» Fällung des Bence-Jones'schen Körpers mittelst Soda und neutralisirt, so erhält man nach Huppert einen Niederschlag, dagegen bleibt die Lösung klar nach Neumeister und Ellinger, aber nur, wenn genügend Wasser zur Lösung vorhanden ist. Diese Angabe, diese specielle Bedingung, kann ich bestätigen.

7. Die Fällungsgrenzen beim Aussalzen mit Ammonsulfat gibt Ellinger mit 2 bezw. 4 ccm. an; ich fand sie zu 4 bezw. 6 ccm. im Harn, und etwas höher in einer dialysirten Lösung. Aber Ellinger's Angaben beziehen sich auf eine Lösung des isolirten Körpers, der vorher eine Coagulation durchgemacht hatte und erst wieder durch siedende Natriumcarbonatlösung in Lösung gebracht worden war, und für diesen Fall liegen die Fällungsgrenzen erheblich tiefer (ich fand sie gelegentlich bei 0,6 bezw. 2,2 ccm. cf. S. 213). Auch hier ist also keine thatsächliche Differenz zwischen dem Verhalten in Ellinger's und meinem Fall vorhanden.

Ich glaube durch den eingehenden Vergleich sicher gestellt zu haben, dass die in den bisher untersuchten Fällen gefundenen «Bence-Jones'schen Körper» identisch sind, und komme nunmehr zu der wichtigeren Frage:

V. Welcher Klasse von Eiweiskörpern gehört der Bence-Jones'sche Körper an?

Die bisherigen Autoren haben den Körper übereinstimmend als Albumose aufgefasst. Der wesentliche Grund zu dieser Annahme liegt, wie bekannt, in der Löslichkeit der auf verschiedene Weise erzeugten Fällungen bei Siedetemperatur, ein Verhalten, das den echten Eiweisskörpern nicht zukommt, wohl aber den Verdauungsalbumosen.

Die Anschauungen der Untersucher lassen sich etwa folgendermassen präcisiren:

Kühne fasste das coagulirte unlösliche Präparat als Dysalbumose auf, offenbar aus Heteroalbumose entstanden, in welcher Form der Körper wohl im Harne vorhanden gewesen sein müsste. Deuteroalbumose konnte nach ihm, wenn überhaupt, so jedenfalls nur in Spuren beigemengt gewesen sein, so dass eine genaue Prüfung ihm nicht möglich war. Vielleicht sei auch, so gibt Kühne an, in dem wasserlöslichen spärlichen Extract des Coagulums etwas Protalbumose vorhanden gewesen. Zur Classification als Dysalbumose gab die Unlöslichkeit des durch Erhitzen gewonnenen Niederschlags in neutralen Salzlösungen Veranlassung. Auch Huppert bezeichnet seinen Körper als Heteroalbumose, etwa aus den gleichen Gründen wie Kühne; er legt auf das Unlöslichwerden des Körpers beim Aussalzen mit Kochsalz bei 35—40° den Nachdruck. Deuteroalbumose hielt er mit Sicherheit für ausgeschlossen, da durch Kochsalz allein ohne Zusatz von Essigsäure der Eiweisskörper vollständig ausgeschieden war; die Möglichkeit einer geringen Beimengung von Protalbumose lässt er zu. In dem ausführlichen Referate von Zeehuysen über Ribbink's Arbeiten findet sich keine bestimmte schärfere Rubricirung seiner Albumose. Matthes (Neumeister) und ebenso Ellinger weisen zwar auf die grosse Aehnlichkeit ihrer Körper mit den Verdauungsalbumosen hin, geben aber mit Bestimmtheit an, dass er mit keiner der bekannten identisch sei. Einmal scheidet ihn nach Matthes von letzteren die scheinbare Coagulation, die er zwischen 50 und 60° schon bei geringem Salz- und Säuregehalt erleidet; keine Verdauungsalbumose zeigt unter den gleichen Bedingungen dieses Verhalten. Ein weiterer Unterschied liege in Folgendem: bei 100° sind die durch irgend welche Reactionen erhaltenen Niederschläge der Albumosen auch bei grösstem Salzgehalt völlig löslich: bei dem Bence-Jones'schen Körper genüge schon mässige Erhöhung des Salzreichthums, um die Wiederauflösung der Fällungen in der Siedehitze zu verhindern. Speciell von der Heteroalbumose weicht er nach Matthes in der Hinsicht ab, dass er nicht wie jene bei der Dialyse sich ausscheidet.

Auf diese Momente legt auch Ellinger grossen Werth. Dieser Autor betont ferner die eigenthümliche «Albumosat»-Bildung bei dem Bence-Jones'schen Körper, die den Albumosen nicht zukommt, worauf schon Kühne nachdrücklich hingewiesen hat.

Die Gründe, die Matthes und Ellinger gegen die Identificirung mit einer «Verdauungsalbumose» und speciell mit der Heteroalbumose ins Feld führen, sind durchaus stichhaltig und treffen auch für meinen Fall zu.

Seitdem in jüngster Zeit die Heteroalbumose eingehender erforscht ist, seitdem man nicht nur ihre Fällungsbedingungen kennt, sondern auch einige Bestandtheile derselben studirt hat, ist der Unterschied des Bence-Jones'schen Körpers von dieser Substanz noch viel stärker hervorgetreten.

Folgende Uebersicht, die keiner Erläuterung bedarf, zeigt die fundamentalen Unterschiede zwischen beiden Körpern:

	Kohlen- hydrat- reaction	Spaltungsprodukte			Ge- samt- N.	« Diamino- » Stickstoff
		bei der Pepsin- verdauung Protalbumose	bei der Spaltung mit Säure Glyko- koll	Tyrosin		
Heteroalbumose (des Fibrins)	—	—	+	wenig	17,98%	7,0% = 89% des Gesamt-N.
Bence-Jones-Körper	+	+	—	viel	15,57%	8,87% = 25% des Gesamt-N.

Nach den hie und da trügerischen Fällungsreactionen nicht nur, sondern auch nach der Zusammensetzung des Moleküls sind der Bence-Jones'sche Körper und die Heteroalbumose des Fibrins völlig verschiedene Körper.

In dem Falle von Rosin wird keine eingehende Analyse der Albumosennatur des Bence-Jones'schen Körpers gegeben, doch sagt Süssmann, sie hätte «nicht völlig mit Kühne's Albumosen übereingestimmt». Zu allen diesen Angaben ist freilich zu bemerken, dass sich der Vergleich mit den Verdauungsalbumosen immer nur auf diejenigen des Fibrins beschränkt.

Wie aber auch die Autoren sich im Einzelnen aussprechen, so fassen sie doch ausnahmslos den Bence-Jones'schen Körper als eine Albumose auf.

Meine Beobachtungen zwingen zu dem Schluss, dass diese Annahme nicht richtig ist: ich muss den Körper als eine den echten Eiweisskörpern nahestehende Substanz bezeichnen.

Für seine Albumosennatur spricht nur ein äusserliches analytisches Merkmal: die Löslichkeit seiner durch verschiedene Mittel erhaltenen Niederschläge in der Hitze. Diese Eigenschaft ist es gewesen, die die bisher geltende Auffassung dieses Körpers als einer Albumose veranlasst hat. Sie ist aber einerseits hier, wie ich oben gezeigt habe, so abhängig von äusseren Bedingungen (Salzgehalt, Reaction, Dichte der Lösung, Gehalt an nicht salzartigen Körpern), dass sie unter Umständen ganz verloren gehen kann. Andererseits kann sie nach den Befunden Spiro's nicht zu einer Abtrennung von den coagulablen Eiweisskörpern genügen.

Gegen die Albumosennatur des Bence-Jones'schen Eiweisskörpers sprechen hingegen die drei folgenden wichtigen Gesichtspunkte:

1. Die vollständige Coagulirbarkeit unter gewissen Bedingungen in der Hitze und das leichte Unlöslichwerden des durch Alkohol oder durch Salz und Säure in der Kälte erhaltenen Niederschlags in Wasser und neutralen Salzlösungen. Für die Albumosen ist es charakteristisch, dass sie unter diesen Bedingungen löslich bleiben (cf. u. a. Neumeister S. 229 seines Lehrbuches, II. Auflage). Nur für die Heteroalbumose hat man bisher eine ähnliche «Coagulation», den Uebergang in eine unlösliche Modification angegeben, der jedoch nicht durch Erhitzen eintritt.

2. Die bekannten Albumosen zeigen keinerlei Andeutung von Syntonin- oder Albuminatbildung. Der Bence-Jones'sche Eiweisskörper hingegen besitzt diese Eigenschaft. Auf die darin liegende Aehnlichkeit mit den genuinen Eiweisskörpern hat schon Kühne (S. 224 der ersten Arbeit) hingewiesen. Ich halte diesen Punkt gleich ihm und Ellinger

für sehr bedeutungsvoll. Freilich wird diese Aehnlichkeit, wie auch Kühne hervorhebt, dadurch etwas eingeschränkt, dass diese durch Neutralisation gewonnenen Fällungen, ebenso wie auch die durch Alkohol und durch Erwärmen erzeugten Coagulationsprodukte sich bei Weitem nicht so unlöslich verhalten wie die bei gleicher Behandlung erhaltenen Produkte der echten Eiweisskörper.

3. Der Bence-Jones'sche Eiweisskörper liefert bei der Pepsinverdauung alle bisher bekannten primären und secundären Verdauungsprodukte der Eiweisskörper mit Ausnahme der Heteroalbumose, Dieser Mangel scheidet ihn nicht von den echten Eiweisskörpern; denn auch bei dem Eiweisspaarling des Caseins fehlt die Heteroalbumose.

Dieser letzte Punkt ist von ausschlaggebender Bedeutung. Nach Zunz²⁸⁾ und Pick^{14a)} stellen die Proto-, die Heteroalbumose und ein der Gruppe der «secundären Albumose B» angehöriger Körper*) neben anderen noch unbekannten Substanzen die «primären» Spaltungsprodukte, die höchstzusammengesetzten Bausteine des Eiweissmoleküles, dar.

Da der Bence-Jones'sche Körper mit Sicherheit eines dieser primären Spaltungsprodukte, die Protalbumose neben anderen Albumosen abzuspalten gestattet, so ist er den echten Albumosen in Bezug auf Complicirtheit des Baues übergeordnet und steht darnach den echten Eiweisskörpern näher. Ihn einer bestimmten Gruppe derselben einzureihen, ist allerdings zur Zeit nicht möglich. Von allen unterscheidet ihn die relative Löslichkeit in der Hitze und die leichte Auflösbarkeit der Alkoholfällung durch verdünntes Ammoniak. Wenn er auch in dieser Hinsicht an die Histone erinnert, so kann er ihnen doch wegen des Abgangs der charakteristischen NH_2 -Reaction nicht beigezählt werden. Von den meisten genauer gekannten Eiweissstoffen unterscheidet ihn das Fehlen des Heteroalbumosencomplexes; letzteres wichtige Moment theilt er mit

*) Ein von dieser verschiedener (kohlenhydratfreier) Körper, der mit ihm zusammen ausgefällt wird, wird bei der Verdauung der Proto- und der Heteroalbumose erhalten (Pick); dieser ist kein primäres Spaltungsprodukt mehr.

dem Casein, doch trennt ihn von diesem das Fehlen des Phosphors und vor Allem die Anwesenheit eines Kohlenhydrat-complexes. Mit dem Globulin theilt er die etwas höheren «Fällungsgrenzen» der bei der Verdauung abgespaltenen «secundären Albumose A». Die Löslichkeit in salzfreiem Wasser, die Nichtfällbarkeit beim Einleiten von Kohlensäure wie durch Magnesiumsulfatsättigung sind leicht zugängliche analytische Unterschiede, die den Bence-Jones'schen Körper von den Globulinen sicher trennen.

Ob man unter diesen Verhältnissen noch an der bisher gebräuchlichen Bezeichnung «Bence-Jones'sche Albumose» und «Albumosurie» festhalten soll, erscheint ernster Erwägung werth. Am besten belässt man es wohl zunächst bei dem nichts präjudicirenden Namen «Bence-Jones'scher Eiweisskörper». Der für das klinische Bild so bequeme Ausdruck der Bence-Jones'schen «Albumosurie» könnte trotz gewisser Bedenken durch «Bence-Jones'sche Albuminurie» ersetzt werden.

VI. Bemerkungen über die Herkunft und Bildungsstätte des Bence-Jones'schen Körpers.

Ueber die Herkunft des Bence-Jones'schen Körpers, d. h. über den Ort der Bildung und die chemische Art seiner Entstehung lassen sich präzise Angaben zur Zeit nicht machen, immerhin aber einige Anhaltspunkte gewinnen. Die interessante Substanz entspricht keinem der bekannten in der Nahrung enthaltenen, bei der Verdauung entstehenden oder im Thierkörper vorkommenden Eiweissstoffe so nahe, dass man mit genügender Sicherheit den Schluss auf eine direkte Abstammung von einem derselben ziehen kann. Das ist um so bemerkenswerther, als die Menge, in der er im Harn auftritt, keineswegs unbedeutend ist. Einige Autoren fanden freilich nur kleinere Quantitäten im Harn, so Ellinger $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ ‰, Askanazy $\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{4}$ ‰, Huppert 3 ‰, Fitz 0,1—0,25 ‰, Süssmann 6 ‰, Matthes-Seegelken 4—6 ‰; grössere Mengen sind gefunden von Bozzolo 1 ‰, Ribbink 2 ‰, von mir 1,8—2,4 ‰. Bei Bence-Jones vollends «enthielt

der Urin fast so viel Eiweiss wie das Blutserum, nämlich 6,7 0/0. Die Tagesausscheidung betrug bei Huppert 6,7 g; bei Matthes 8 g, bei Süssmann 12 g, bei mir bis zu 36 g und bei Bence-Jones sogar 70 g. Ein Seitenstück zu diesen beiden Fällen stellt die Beobachtung von Bramwell und Noel Paton¹⁹⁾ dar; sie fanden im Urin einen anderen pathologischen Eiweisskörper, ein krystallisirendes Globulin,*) dessen Menge am Tage bis zu 70 g stieg ($1\frac{1}{2}$ —7 0/0 im Harn).

Diese Mengenverhältnisse erlauben auf den Ort, an dem die seltene Substanz entsteht, wenigstens einen negativen Schluss zu ziehen.

Zumeist hatte man bisher angenommen, dass der Bence-Jones'sche Körper in den das klinische Bild bedingenden pathologischen Geschwülsten, den Myelomen, entstände; man hat sein Vorkommen in diesen auch bis zu einem gewissen Grad von Sicherheit wahrscheinlich machen können (Ellinger); für seine Entstehung an diesem Ort aber ist sein Vorkommen daselbst nicht beweisend. Auf Grund meines und des Bence-Jones'schen Falles lässt sich die bisher geltende Annahme vielmehr direkt widerlegen: Die Quantität des im Harn erscheinenden Eiweisskörpers ist zu gross, als dass sie in jenen kleinen Geschwülsten entstanden sein könnte. — Die Gesamtmenge des in den Rippen enthaltenen Markes beträgt nicht mehr als ca. 200 g,**) mit rund $\frac{1}{5}$ = 40 g Eiweiss. Nur ein Theil dieses Markes ist durch Myelome ersetzt; dazu kommen freilich noch die in anderen Skeletttheilen vorhandenen Geschwülste, doch ist deren Gesamtgewicht nur in seltenen Fällen ein sehr erhebliches (über 500 g = 100 g Eiweiss), zum Mindesten nicht im Beginn, während der Entwicklung der Krankheit, und zu dieser Zeit erreichte die Ausscheidung des Bence-Jones'schen Körpers, wenigstens in meinem Fall, die höchsten Grade. — Dass in (relativ) so kleinen Geschwülsten täglich 36 und 70 g eines abnormen Eiweisskörpers gebildet werden sollten, eine

*) Huppert fasste ihn ursprünglich als Heteroalbumose auf, hat aber diese Anschauung später berichtigt.

**) Berechnet nach Dursy u. Friederich in Vierordt's Tabellen.

Menge, die das Eigentrockengewicht der Neubildungen wahrscheinlich übertrifft, erscheint ganz ausgeschlossen. Wie kolossal müsste dann der Blut- und Saftstrom durch die wenig ausgebildeten Gefässe dieser Myelome sein, wie reichlich der Saft- und Lymphstrom durch das Gewebe derselben!

Eher könnte man vielleicht das Knochenmark des ganzen Körpers in toto, also auch in den nicht veränderten Partien, als Bildungsstätte des Bence-Jones'schen Körpers gelten lassen: der Fall von Askanazy, in dem ja das Knochenmark keine Myelome, sondern eine diffuse lymphadenoide Degeneration aufwies, liesse daran denken.

Führt nun diese quantitative Betrachtungsweise bezüglich des Ortes der Bildung zunächst nur zu einem mehr negativen Ergebniss, so leitet eine weitere Erwägung doch nun zu einigen Gesichtspunkten, die für die spätere Erforschung des Bildungsmateriales und vielleicht auch der Bildungsstätte einen Anhalt geben können.

Schon Noel-Paton hatte aus der abnorm grossen Ausscheidung seines krystallisirenden Globulins den Schluss gezogen, derselbe stamme aus der Nahrung, die «wahrscheinlich in der Leber in irgend einer Weise verändert sei». Seine Absicht, diese Annahme durch Stoffwechselversuche zu erhärten, war der schottische Autor auszuführen leider nicht in der Lage; auch in meinem Fall war es nicht möglich. Paton's Deutung aber scheint (abgesehen von der zweifelhaften Verlegung des Processes in die Leber) richtig; sie dürfte nicht nur für seinen, sondern auch für Bence-Jones' und meinen Fall zutreffen. Das geht aus folgender Betrachtung hervor: Es fand sich im Urin pro die:

Bei	Eiweiss	Anderer N	Gesammt-N	Eiweiss-N Gesammt-N
Noel-Paton	68,9 g = 11,0 g N	16,2	27,2	41 %
Bence-Jones	70 g = 10,9 g N	< 12,0*)	< 23,0	47 %
Magnus-Levy	36 g = 5,6 g N	11,0	16,6	35 %

*) Diese Zahl lässt sich als «Maximalzahl» aus den übrigen Angaben Bence-Jones über Trocken-, Salz- und Eiweissgehalt des Harnes berechnen.

In keinem dieser Fälle handelte es sich um acute Körperconsumption, die Krankheit dauerte Jahre, die Kranken magerten nicht sehr rapide ab. Somit stammen die enormen Eiweissmengen des Urins, die $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ des gesammten Eiweissumsatzes betragen, nicht aus zerfallenem und nicht wieder regenerirtem Körpereiwiss, sondern direkt oder indirekt aus der Nahrung.*) Indirekt, wenn das Nahrungseiwiss erst in das normale Körpereiwiss übergeht und aus diesem der Bence-Jones'sche Körper entsteht; direkt, wenn letzterer unmittelbar aus den im Darmkanal durch Zerfall des Eiweisses gebildeten Spaltungsprodukten des Nahrungseiwisses aufgebaut wird, ohne die Zwischenstufen des normalen Körpereiwisses durchlaufen zu haben. In beiden Fällen bleibt die Alternative offen, ob es sich um ein normales oder ein pathologisches Produkt des Stoffwechsels handelt; es könnte sich ja um ein stets auftretendes Assimilations- oder Abbauprodukt handeln: Während dasselbe sonst zur Ernährung der Organe, zum Aufbau des Zellprotoplasmas dient oder eine Zwischenstufe im Abbau darstellt, würde es in unserem Fall aus unbekannten Gründen vor Erreichung der Endformen in den Kreislauf übergehen und so der Ausscheidung verfallen; oder aber es erfolgt der Aufbau des Eiweisses resp. sein Abbau in abnormen Bahnen. Eine nähere Betrachtung dieser verschiedenen Möglichkeiten bietet mehrfaches Interesse, führt aber wegen Unzulänglichkeit des Thatachenmaterials nicht zu genügend gesicherten Schlüssen. Nur auf ein einzelnes Moment möchte ich daher noch kurz verweisen, da es auf experimenteller Grundlage ruht.

Wie W. Kühne erwähnt, sah Stokvis den Bence-Jones'schen Eiweisskörper nach intravenöser Einführung in

*) In letzter Instanz stammen ja schliesslich alle Bestandtheile des Körpers, alle seine Ausscheidungen aus der Nahrung, und nur der besondere Umfang der Ausscheidung, die zu einem sofortigen und andauernden Nachschub einen Ersatz fordert, nöthigt dazu, hier die Herkunft aus der Nahrung besonders zu betonen, und neben der indirekten, die für die gewöhnliche Anschauung nichts Verwunderliches an sich hat, auch eine direkte Herkunft aus dem Eiweiss der Nahrung ins Auge zu fassen.

den Harn übertreten. Ellinger führte die kolossale Menge von 5 g in 75 ccm. Sodalösung innerhalb zwei Minuten in die Vene eines kleinen Hundes von 6 kg Gewicht ein. Der innerhalb 24 Stunden aufgefangene Harn enthielt den Bence-Jones'schen Eiweisskörper nicht, gab mit Ammonsulfat gesättigt keinen Niederschlag, dagegen im Filtrat starke Biuret-reaction. Unter Vernachlässigung der summarischen Angabe von Stokvis geht daraus hervor, dass der Bence-Jones'sche Körper, selbst bei enormer Ueberschüttung des (gesunden Hunde-) Organismus, keineswegs im Organismus unangreifbar ist. Damit ist die naheliegende Vorstellung, dass die Ausscheidung dieser Eiweisssubstanz durch seine Unangreifbarkeit im Stoffwechsel bedingt sei, unwahrscheinlich geworden, wenngleich zuzugeben ist, dass die Verhältnisse beim Menschen und speciell beim Kranken möglicher Weise anders liegen als beim Hund.

Bei der Seltenheit typischer Fälle von Bence-Jones'scher Albuminurie ist eine baldige Aufklärung dieser und vieler anderer sich anschliessenden Fragen kaum zu hoffen.

Ebenso thut man gut, die Frage offen zu lassen, welcher Zusammenhang zwischen der Knochenmarksveränderung (Myelome — lymphadenoide Umwandlung) und dem Auftreten des Bence-Jones'schen Körpers im Urin besteht. Die Wahrscheinlichkeit einer irgendwie gearteten causalen Verknüpfung zwischen den beiden Processen wird nicht erschüttert durch den Umstand, dass bei den eben genannten Veränderungen des Knochenmarks in manchen Fällen und bei andersartigen Tumoren desselben der Harnkörper vermisst wird. In diesen Fällen könnte ja wohl der Körper gebildet oder der Weg zu seiner Bildung eingeschlagen worden sein, er aber oder seine Vorstufen der Spaltung und Verbrennung dauernd oder zeitweise zugänglich sein. (Von Stokvis und Matthes²⁷) werden Fälle berichtet, in denen das pathologische Eiweiss dauernd resp. zeitweise aus dem Urin verschwand). Fälle hingegen, in denen bei Bence-Jones'scher Albuminurie normale Beschaffenheit des Knochenmarks durch die Autopsie nachgewiesen wäre, stehen noch aus (Fall Fitz ist ohne Section!).

Litteratur.

I. Fälle in denen der Bence-Jones'sche Körper auftrat.

1) Bence Jones (Mac.-Intyre. Medical Chirurgical Transactions. 1850. Bd. 33). Philosophical Transactions of the royal society. London, 1848.

2) W. Kühne (Stokvis), Ueber Hemialbumose im Harn. Zeitschr. f. Biol., Bd. XIX, S. 209.

W. Kühne und R. H. Chittenden, Ueber Albumosen. Zeitschr. f. Biol., Bd. XX, S. 11. cf. S. 40 ff.

3) Huppert, Ueber einen Fall von Albumosurie. Prager med. Wochenschr. 1889. S. 35. (Klin. Beschreibung desselben Falls durch Kahler ibidem.)

4) Stokvis, Ribbink, Zeehuysen. Referat in Maly's Jahresbericht. 1891. Bd. 21, S. 412. 1892. Bd. 22, S. 525. 1893. Bd. 22, S. 577.

5) Matthes, Ueber Eiweisskörper im Urine bei Osteomalacie. Verhandl. d. 14. Congresses f. innere Medicin. 1896. S. 476.

cf. dazu Neumeister, Lehrbuch d. physiolog. Chemie. II. Aufl., S. 809. 1897 und

Seegelken, Ueber multiples Myelom u. s. w. Deutsches Archiv f. klin. Medicin. Bd. 58, S. 276. 1897.

6) H. Rosin, Ueber einen eigenartigen Eiweisskörper etc. Berl. klin. Wochenschr. 1897. S. 1044, Nr. 48.

Ausführliche Beschreibungen:

Süssmann, Ueber einen neuen Fall von multipler Myelombildung u. s. w. Doctordissertation Leipzig. 1897.

Senator, Asthen. Lähmung, Albumosurie u. s. w. Berl. klin. Wochenschr. 1899. Nr. 8.

7) Ellinger, Ueber das Vorkommen des Bence-Jones'schen Körpers im Harn u. s. w. Deutsches Archiv f. klin. Medicin. Bd. 62, S. 255. 1898

8) Bozzolo, Sulla malattia di Kahler. La clinica medica italiana 1898. Citirt nach dem Referat im Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1898. S. 572.

9) Naunyn, Deutsche med. Wochenschr. 1898. Vereinsbeilage S. 217.

10) Bradshaw, Brit. medical Journal. 1898. Bd. I, S. 1136.

11) Sternberg, Die Knochenerkrankungen in Nothnagel's Handbuch S. 58. (Autopsie nicht gemacht; Identification des Bence-Jones'schen Körpers durch Freund [Wien]).

12) Askanazy, Ueber die diagnostische Bedeutung der Bence-Jones'schen Albumosurie. Deutsche med. Wochenschr. 1899. Vereinsbeilage S. 177.

12a) Fitz, Albumosurie und Myxoedem. American Journal of med. science. 1898. Bd. I, S. 30.

18) Byron Bramwell u. Noel Paton. On a crystalline Globuline occurring in human Urine. Laboratory Reports of the royal College of Physicians. Edinburgh. Bd. 4. 1892. S. 47.

cf. dazu Huppert, Ueber einen Fall von Albumosurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1896. Bd. XXII, S. 500. — Ueber den Noel Paton'schen Eiweisskörper. Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1898. S. 481.

14) Ernst P. Pick, Untersuchungen über die Proteinstoffe. II. — Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. XXIV, S. 246.

14a) Ernst P. Pick, Zur Kenntniss d. pept. Spaltungsprodukte des Fibrins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXVIII, S. 219.

15) J. Pohl, Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn u. s. w. Archiv f. exper. Pathol. und Pharmacol. Bd. XX, S. 426.

16) Hausmann Walter, Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXVII, S. 95.

17) Alexander F., Zur Kenntniss des Caseins u. seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXV, S. 411.

18) Umber F., Die Spaltung des krystallin. Eieralbumins u. s. w. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXV, S. 258. *

19) Kauder, Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. Archiv f. exper. Pathol. und Pharmacol. Bd. XX, S. 411.

20) Spiro, Ueber Nachweis u. Vorkommen des Glykokolls. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXVIII, S. 174.

21) F. Hofmeister, Ueber die Darstellung von krystallinischem Eieralbumin etc. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XIV, S. 165.

22) Gürber, Krystallisation des Serumalbumins. Sitzungsbericht der Würzburger physiol.-med. Gesellschaft. Bd. XXVIII. 1894.

23) Moraczewski, Ueber das Verhalten des Caseins u. s. w. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXI, S. 71. — Ueber das Verhalten des Vitellins u. s. w. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXV, S. 252.

24) Pappenheim, Ueber Lymphämie u. s. w. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. XXXIX, cf. S. 139.

25) Pauli, Die physikal. Zustandsänderungen der Eiweisskörper. Pflüger's Archiv. Bd. LXXVIII, S. 315.

26) S. Gruzewska, Krystallisation des Blutalbumins. Compt. rend. de l'Acad. des sciences 128, 1535.

27) Matthes, Discussion zum Vortrag von Magnus-Levy, Congress für innere Medicin 1900.

28) Zunz, Ueber den quantitativen Verlauf per peptischen Eiweiss-spaltung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXVIII, S. 132.

Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze.

Zweite Abhandlung.

Von

E. Schulze.

(Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Juni 1900.)

Durch die von mir und meinen Mitarbeitern ausgeführten Untersuchungen ¹⁾ ist bewiesen worden, dass die Keimlinge verschiedener Gewächse, nachdem man sie unter Lichtabschluss 2—3 Wochen lang sich hat entwickeln lassen, in Bezug auf die Qualität der aus ihnen darstellbaren Stickstoffverbindungen vielfach grosse Verschiedenheiten zeigen. So sind manche Keimpflanzenarten reich an Asparagin, andere dagegen an Glutamin; aus manchen kann man Leucin und Tyrosin abscheiden, aus anderen Leucin und Amidovaleriansäure, wieder aus anderen Amidovaleriansäure und Phenylalanin; manche Objecte enthalten Arginin in beträchtlicher Menge, während diese Base sich aus anderen nicht abscheiden liess.

Zur Erklärung dieser Erscheinung, die sich nicht auf eine ungleiche Constitution der in den bezüglichen Samen enthaltenen Eiweisskörper zurückführen lässt, habe ich eine Hypothese aufgestellt, welche in folgenden Sätzen kurz wiedergegeben werden kann: «Beim Eiweisszerfall in den Keimpflanzen entsteht ein Gemenge von Stickstoffverbindungen, in welchem wahrscheinlich die auch bei der Spaltung der Eiweissstoffe durch Säuren oder durch Trypsin ausserhalb des Orga-

¹⁾ Ich verweise auf meine erste Abhandlung «über den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze» (Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 18—114) sowie auf zwei Abhandlungen über das wechselnde Auftreten einiger krystallinischen Stickstoffverbindungen in den Keimpflanzen (in der gleichen Zeitschrift, Bd. XX, S. 306—326 und Bd. XXII, S. 411—434).

nismus entstehenden Amidosäuren der fetten und der aromatischen Reihe sowie die Hexonbasen niemals fehlen. Im Stoffwechsel der Keimpflanzen erfährt ein Theil dieser Produkte bald eine Umwandlung, bei welcher in manchen Keimpflanzen Asparagin, in anderen Glutamin synthetisch gebildet wird. Darin liegt der Grund für die starke Anhäufung dieser beiden Amide in den Keimpflanzen. Dass neben ihnen bald mehr, bald weniger Leucin, Tyrosin, Arginin etc. sich findet, hat seine Ursache darin, dass diese Produkte der Eiweisszersetzung in den verschiedenen Keimpflanzen bald rascher, bald weniger rasch umgewandelt werden.»

Nach dieser Hypothese finden wir also neben Resten der primären Eiweisszersetzungsprodukte in den Keimpflanzen Stickstoffverbindungen vor, die durch Umwandlung der beim Eiweisszerfall zuerst gebildeten Stoffe entstanden und demnach als secundäre Produkte des Eiweissumsatzes zu bezeichnen sind. Zu den letzteren gehören Asparagin und Glutamin. Doch muss es für möglich, vielleicht sogar für wahrscheinlich erklärt werden, dass diese beiden Amide zum Theil beim Eiweisszerfall entweder direkt gebildet oder aus der bei diesem Process entstandenen Asparaginsäure und Glutaminsäure unmittelbar hervorgegangen sind.

In seinem Handbuch der Pflanzenphysiologie¹⁾ will W. Pfeffer die wechselnde Beschaffenheit der in den Keimpflanzen sich findenden Produkte des Eiweissumsatzes in anderer Weise erklären. Er nimmt an, dass ein Eiweissstoff bei seiner Spaltung in Folge eines in verschiedener Weise ausgeführten Abbaues unter verschiedenen Umständen ein ganz ungleich zusammengesetztes Gemenge stickstoffhaltiger Zersetzungsprodukte liefern kann.

Die Gründe, welche mich veranlassen, auch gegenüber dieser Theorie Pfeffer's an den von mir ausgesprochenen Ansichten festzuhalten, habe ich in dieser Zeitschrift²⁾ dar-

1) II. Auflage, S. 464.

2) Bd. XXVI, S. 416—424.

gelegt. Diese Gründe liegen einerseits in den beim Studium des chemischen Verhaltens der Eiweisskörper ausserhalb des Organismus gemachten Erfahrungen, andererseits in Beobachtungen, die bei der qualitativen und quantitativen Untersuchung von Keimpflanzen von uns gemacht worden sind. Von Gewicht ist u. A. die Thatsache, dass manche Keimpflanzen von geringem Alter Leucin und Tyrosin lieferten, während diese beiden Amidosäuren aus älteren Pflänzchen gleicher Art nicht mehr dargestellt werden konnten.

Wenn ich auch in den oben citirten Abhandlungen schon eine beträchtliche Anzahl von Thatsachen zur Stütze der von mir aufgestellten Hypothese anführen konnte, so war es doch mein Wunsch, noch weitere Beweise für dieselbe beizubringen. Ein Weg, welcher zur Gewinnung solcher Beweise führen konnte, war durch die oben erwähnten Beobachtungen über das Verschwinden von Tyrosin und Leucin aus manchen Keimpflanzen bei längerem Wachsthum der letzteren vorgezeichnet. Ist jene Hypothese richtig, so darf man erwarten, dass in Keimpflanzen von geringem Alter die primären Produkte des Eiweisszerfalls sich vollständiger vorfinden, als in den älteren Pflänzchen und dass durch eine Vergleichung der an Keimpflanzen verschiedenen Alters gewonnenen Resultate eine mit der fortschreitenden Entwicklung der Pflänzchen verbundene Verschiebung des Mengenverhältnisses zwischen Asparagin und den neben diesem Amide auftretenden Amidosäuren und Hexonbasen sich nachweisen lässt. Diese Erwartung hat sich in der That vollkommen erfüllt.

Als Objecte für die neuen Untersuchungen benutzte ich Keimpflanzen von *Vicia sativa*, *Pisum sativum*, *Lupinus albus* und *Lupinus luteus*, welche theils im Freien in fruchtbarer Erde, theils in grossen mit Sand gefüllten Kasten im Zimmer gezogen wurden. Nach der Ernte wurden sie durch Waschen mit Wasser von anhängenden Erd- und Sandtheilchen so weit als möglich befreit, sodann dünn ausgebreitet in einem geräumigen Trockenschrank bei einer etwas unter 60° liegenden Temperatur getrocknet und schliesslich zerkleinert. Die Lupinus-

Keimpflanzen wurden vor dem Trocknen in die Cotyledonen und die übrigen Pflanzentheile (später der Kürze halber meistens als Axenorgane bezeichnet) zerlegt. In zwei Fällen, nämlich bei einer Cultur von Wicken- und einer Cultur von Erbsen-Pflänzchen wurde jedoch aus besonderm Grunde (vgl. w. u.) das Trocknen in anderer Weise ausgeführt; die Wicken-Pflänzchen wurden nämlich bei 75—80° getrocknet, die Erbsen-Pflänzchen dagegen gleich nach der Ernte in Alkohol geworfen und erst nach mehrwöchentlichem Verweilen unter letzterem in ganz gelinder Wärme (25°—30°) ausgetrocknet (nachdem zuvor der Weingeist abgegossen war).

Um das Entwicklungsstadium der Pflänzchen zu charakterisiren, habe ich im Folgenden neben der Vegetationsdauer entweder die Länge der Keime mit Ausschluss der Wurzel oder, und zwar bei den *Lupinus*-Keimpflanzen, das Verhältniss zwischen dem Trockengewicht der Cotyledonen und demjenigen der übrigen Pflanzentheile angegeben. Dass nur Pflänzchen, die nach ihrem Aussehen für gesund erklärt werden konnten, von mir untersucht worden sind, braucht kaum gesagt zu werden.

Was die Methoden betrifft, deren ich mich bei der chemischen Untersuchung der Keimpflanzen bediente, so genügt es, darüber nur kurze Angaben zu machen; einer eingehenden Beschreibung dieser Methoden bedarf es nicht. Denn ich habe über die Art und Weise, in welcher die Amidosäuren sich aus den Keimpflanzen abscheiden und sich von einander trennen lassen, schon in früher publicirten Abhandlungen¹⁾ ausführliche Mittheilungen gemacht. Für die Abscheidung und Trennung der Hexonbasen bediente ich mich der von Kossel angegebenen Methoden, die auch in diesem Falle wieder vortreffliche Dienste leisteten.

Im Folgenden theile ich zunächst die bei der Untersuchung der Keimpflanzen unmittelbar erhaltenen Resultate mit und gehe dann später zu den Schlussfolgerungen über,

¹⁾ M. vergl. Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 24—36, sowie auch Bd. XVII, S. 208—212 u. Bd. XXII, S. 414—419.

zu denen diese Resultate führen. Bei Ableitung der Schlussfolgerungen mache ich die Voraussetzung, dass die in den Keimpflanzen sich vorfindenden Amidosäuren und Hexonbasen, ebenso wie das Asparagin und Glutamin Produkte des mit dem Keimungsvorgang verbundenen Eiweissumsatzes sind.

Diese Voraussetzung basirt auf folgenden Thatfachen: Aus ungekeimten Samen hat man meines Wissens bis jetzt nur einmal Asparagin isolirt; S. Frankfurt¹⁾ fand dieses Amid in den von den Weizenkörnern abgetrennten Keimlingen, die man als Abfallprodukt der Müllerei leicht in beträchtlicher Quantität, wenn auch nicht frei von Theilen des Endosperms, erhalten kann. Die Asparaginmenge, welche Frankfurt aus den Keimen abzuscheiden vermochte, war aber so gering, dass man behaupten kann, das genannte Amid sei im ganzen Weizenkorn nur in Spuren vorhanden. Aus ungekeimten Lupinen- und Wickensamen haben wir Asparagin nicht zu isoliren vermocht. Amidosäuren hat man aus ungekeimten Papilionaceensamen meines Wissens bis jetzt noch niemals darstellen können. Aus den Samen von *Vicia sativa* und *Vicia faba* hat bekanntlich Ritthausen stickstoffreiche krystallisirbare Stoffe, das Vicin und das Convicin, isolirt; in seinen bezüglichlichen Versuchen sind aber Amidosäuren, so viel mir bekannt ist, nicht zum Vorschein gekommen, ebensowenig bei einer von mir nach Ritthausen's Vorschrift ausgeführten Darstellung von Vicin aus Wicken-samen. Aus den Samen von *Lupinus luteus* habe ich schon vor langer Zeit Amidosäuren vergeblich darzustellen gesucht. Jetzt habe ich noch die Samen von *Pisum sativum* auf Amidosäuren und auf Hexonbasen untersucht; das Resultat der Untersuchung, deren Einzelheiten ich weiter unten noch mittheilen werde, war ein negatives. Wenn auch diese Thatfachen nicht den Beweis für das gänzliche Fehlen

1) Landwirthschaftl. Versuchsstationen, Bd. 47, S. 446. Es ist denkbar, dass hier das Asparagin gewissermassen als Reservestoff fungirt, was auch wohl für das nach den Untersuchungen von Reinke und Rodewald (Studien über das Protoplasma) in *Aethalium septicum* vorkommende Asparagin gilt.

von Amidosäuren, Hexonbasen und Asparagin in den ungekeimten Papilionaceensamen liefern, so zeigen sie doch, dass man die genannten Stoffe mit Hülfe der zur Zeit uns zur Verfügung stehenden Methoden aus jenen Samen nicht zu isoliren vermochte; wir sind daher berechtigt, die mit Hülfe dieser Methoden aus den Papilionaceenkeimpflanzen abscheidbaren Stoffe jener Art für Produkte zu erklären, die erst während des Keimungsvorgangs entstanden sind.

A. Versuche mit *Viola sativa* (Wicke).

Bekanntlich hat v. Gorup-Besanez¹⁾ in Keimpflanzen von *Vicia sativa*, welche theils 2 Wochen, theils länger bei Lichtabschluss oder bei spärlichem Lichtzutritt vegetirt hatten, neben Asparagin Leucin, später auch Glutamin, nachgewiesen; Tyrosin konnte er aus denselben nicht isoliren, fand aber, dass das Rohleucin mit Millon'schem Reagens Tyrosinreaction gab. Zu bemerken ist noch, dass der genannte Forscher sein Leucin, so viel bekannt ist, nicht analysirt hat; das von ihm untersuchte Präparat kann also ein Gemenge von Leucin und Amidovaleriansäure gewesen sein.²⁾ Später habe ich³⁾ dreiwöchentliche etiolirte Keimpflanzen von *Vicia sativa* unter Verwerthung der beim Studium des Stoffgehalts anderer Keimpflanzen von mir gemachten Erfahrungen untersucht; ich fand darin neben Asparagin Leucin, Amidovaleriansäure, Phenylalanin, Guanidin, Cholin und Betain. Arginin vermochte ich mit Hülfe der Methoden, die mir zur Darstellung dieser Base aus anderen Keimpflanzen gedient haben, aus den etiolirten Wickenkeimlingen nicht zu isoliren; ebensowenig gelang mir die Isolirung von Tyrosin. Auf Glutamin habe ich die Pflänzchen nicht untersucht. Da andererseits v. Gorup-Besanez seine Pflänzchen weder auf

¹⁾ Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 7, S. 146 und 569, Bd. 10, S. 780.

²⁾ Die Reactionen, deren sich v. Gorup-Besanez zur Identificirung des Leucins bediente, treten auch bei einem Gemenge von Leucin und Amidovaleriansäure ein.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XVII, S. 193.

basische Stickstoffverbindungen noch auf Amidovaleriansäure und auf das damals noch gar nicht entdeckte Phenylalanin untersucht hat, so stehen die von ihm erhaltenen Resultate durchaus nicht im Gegensatz zu den meinigen, und es muss für möglich erklärt werden, dass die von ihm und die von mir untersuchten Pflänzchen die gleichen stickstoffhaltigen Stoffe enthielten.

Am Licht erwachsene Wicken-Pflänzchen, deren Vegetationsdauer drei Wochen betragen hatte, lieferten in einer von D. Prianischnikow¹⁾ ausgeführten Untersuchung neben Asparagin nur eine Amidosäure, nämlich Leucin, und zwar nur in sehr geringer Quantität. Zu dem gleichen Resultat gelangte ich²⁾ bei Untersuchung von Wickenpflänzchen gleicher Art, deren Alter sechs Wochen betrug.

Ich stellte mir nun die Aufgabe, zum Vergleich die stickstoffhaltigen Bestandtheile ganz junger Keimpflanzen von *Vicia sativa* kennen zu lernen. Zu diesem Zweck untersuchte ich drei Culturen 6—7tägiger Keimpflanzen, von denen die eine im Garten unseres Instituts in fruchtbarer Erde unter ganz normalen Verhältnissen, die zweite und dritte in einem verdunkelten Zimmer in Sand gezogen worden waren (da die Keimlinge Anfangs in der Erde stecken, so kann es kaum einen Unterschied machen, ob man während der ersten Keimungsperiode das Licht Zutreten lässt oder nicht; dieser Annahme entsprechen auch die Ergebnisse, die bei Untersuchung jener beiden Culturen erhalten wurden). Um den Entwicklungsgrad der Pflänzchen zu kennzeichnen, führe ich noch an, dass ihre Länge ohne die Wurzel in allen Fällen 7—8 cm. betrug.

Es erschien mir wünschenswerth, diese 6—7tägigen Keimpflänzchen hinsichtlich ihres Stoffgehalts auch noch mit älteren etiolirten Pflänzchen zu vergleichen, welche aus dem gleichen Samen gewonnen waren. Ich untersuchte daher 3¹/₂ wöchentliche Keimpflanzen solcher Art, gezogen in Sand in einem verdunkelten Zimmer.

1) Landwirthschaftliche Versuchsstationen, Bd. 45, S. 247.

2) Ebendasselbst, Bd. 46, S. 383.

a) 6—7tägige Keimpflanzen.

Ich theile zuerst die Ergebnisse mit, die ich bei Untersuchung der im Freien gezogenen Pflänzchen erhielt. 2½ Kilo der getrockneten und zerkleinerten Pflänzchen wurden mit ca. 4 Liter Weingeist von ca. 92 Volumprocent übergossen und 1—1¼ Stunde lang gekocht. Den durch Filtration und Nachwaschen mit Weingeist vom Ungelösten getrennten Auszug verarbeitete ich in der früher wiederholt beschriebenen Weise¹⁾ auf Amidosäuren. Ich erhielt ein im Aussehen dem unreinen Leucin gleichendes Präparat, dessen Gewicht nach längerem Trocknen über Schwefelsäure 8½ g betrug. Da das Ausgangsmaterial nicht sehr fein zerrieben und mit einer nicht sehr grossen Alkoholmenge behandelt worden war, so konnte man vermuthen, dass die vorhandenen Amidosäuren nicht vollständig in den Auszug übergegangen waren. Ein Theil des bei der ersten Extraction verbliebenen Rückstandes wurde daher mit Hülfe der Dreefs'schen Reibe in ein sehr feines Pulver verwandelt und dann noch einmal mit heissem Weingeist extrahirt. Auch dieser Extract lieferte noch Amidosäuren, und zwar 2,7 g pro 1 Kilo des Ausgangsmaterials. Die Gesamtausbeute an Amidosäuren betrug demnach ca. 0,6%, berechnet auf das Gewicht des lufttrocknen, schaaalenhaltigen, von Sand- und Erdtheilchen nicht ganz freien Ausgangsmaterials. Ohne Zweifel ist aber die

1) Der weingeistige Auszug wird der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand mit Wasser behandelt, die trübe Flüssigkeit mit Gerbsäure versetzt. Man bringt aufs Filter (zuvor fügt man etwas Bleiessig zu, falls die Flüssigkeit schwer filtrirbar ist), setzt zum Filtrat Bleizucker oder Bleiessig zu, so lange noch ein Niederschlag entsteht, filtrirt wieder und leitet in das Filtrat Schwefelwasserstoff ein. Die vom Schwefelblei durch Filtration getrennte Flüssigkeit wird im Wasserbade bei gelinder Wärme eingedunstet, bis auf ihrer Oberfläche sich eine Haut bildet. Nach Verlauf von einigen Tagen werden die ausgeschiedenen Amidosäuren auf ein Zeugfilter gebracht, nach dem Abtropfen der Mutterlauge mit etwas Weingeist gewaschen und sodann zwischen Fliesspapier stark abgepresst. In manchen Fällen habe ich die Amidosäuren behufs Entfernung der Mutterlauge auf eine Thonplatte gebracht.

Ausbeute hinter der im Ganzen vorhandenen Amidosäuremenge beträchtlich zurückgeblieben; denn nach der Ausscheidung der Amidosäuren aus den eingeengten Extracten blieb eine dickflüssige Mutterlauge übrig, aus welcher jene Stoffe sicherlich nur unvollständig auskrystallisirt sind.

Das in der beschriebenen Weise erhaltene Amidosäurenpräparat übergoss ich, nachdem es zerrieben worden war, mit absolutem Alkohol, erhitzte die Flüssigkeit im Wasserbade bis fast zum Sieden und fügte dann unter Umschütteln concentrirte Ammoniakflüssigkeit in kleinen Antheilen zu, bis der grösste Theil des Präparats in Lösung gegangen war. Den Rückstand behandelte ich mit kaltem Wasser, wobei eine in diesem Lösungsmittel sehr schwer lösliche Substanz in kleiner Quantität zurückblieb. Diese Substanz erwies sich als Tyrosin. Sie war leicht löslich in wässriger Ammoniakflüssigkeit; aus der so erhaltenen Lösung schied sie sich, nachdem Salzsäure bis zur neutralen Reaction zugefügt war, in feinen Krystallnadeln wieder aus. Sie gab sowohl die Hoffmann'sche wie die Piria'sche Reaction.

Die vom Tyrosin abfiltrirte Flüssigkeit wurde unter eine Glasglocke über Schwefelsäure gestellt, bis das Ammoniak verdunstet und die in Lösung gegangene Substanz grösstentheils wieder ausgeschieden war. Diese Substanz wurde dann noch ein zweites Mal in der gleichen Weise in Lösung und wieder zur Ausscheidung gebracht. Sie bildete nun eine weisse, krystallinische Masse, welche Aussehen und Verhalten des Leucins zeigte. Beim Erhitzen im Glasröhrchen verflüchtigte sie sich unter Bildung eines weissen, wolligen Sublimats; sie löste sich schwer in kaltem, leicht in heissem Wasser; die heisse Lösung lieferte nach Zusatz von Kupferacetatsolution¹⁾ in reichlicher Menge eine Ausscheidung, welche das Aussehen des Leucinkupfers zeigte. Die Analyse gab folgende Resultate:

¹⁾ Die concentrirte Kupferacetatsolution wurde der fast bis zum Kochen erhitzten Leucinlösung in kleinen Portionen zugesetzt; dann liess man erkalten.

Cu-Bestimmungen:

- 1) 0,3290 g Substanz, bei 100° getrocknet, gaben 0,0800 g CuO;
- 2) 0,3392 g " " 100° " " 0,08300 g CuO.

N-Bestimmungen: 1)

- 1) 0,3735 g Substanz gaben nach Kjeldahl's Methode 0,031739 g N;
- 2) 0,3702 g Substanz gaben nach der gleichen Methode 0,031878 g N.

Berechnet für

Gefunden

(C₆H₁₁NO₂)₂Cu

Cu 19,66

19,42 19,55 %

N 8,67

8,50 8,61 %

Die von den Leucinkrystallen abfiltrirten weingeistigen Mutterlaugen lieferten bei weiterem Verdunsten in geringer Quantität noch ein Präparat, welches nach einmaligem Umkrystallisiren aus Weingeist und Ammoniak gleichfalls das Verhalten des Leucins zeigte. Es gab beim Erhitzen im Glasröhrchen ein weisses wolliges Sublimat; mit Kupferacetatlösung gekocht lieferte es eine krystallinische, dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung (freilich nicht in so reichlicher Menge, wie das erste Präparat); es löste sich nicht oder nur zum Theil in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung.

Die im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das aus dem weingeistigen Extract dargestellte Amidosäurenpräparat, abgesehen von dem darin in geringer Menge enthaltenen Tyrosin, grösstentheils, vielleicht sogar fast ausschliesslich aus Leucin bestand. Wäre dem Leucin Amidovaleriansäure oder eine andere Amidosäure von ähnlichem Verhalten in erheblicher Quantität beigemischt gewesen, so würde das Leucin auch nach zweimaligem Umkrystallisiren vermuthlich beim Kochen mit Kupferacetatlösung keine, oder doch nur eine geringe Ausscheidung von Leucinkupfer gegeben haben; mindestens aber würde in

1) Die Ausführung dieser und der w. u. mitgetheilten Stickstoffbestimmung verdanke ich der Gefälligkeit der Herren Dr. E. Winterstein und E. Ritter. Bei der Berechnung aller hier und im Folgenden aufgeführten Analysenresultate wurden die von der deutsch. chem. Gesellschaft für diesen Zweck festgesetzten Atomgewichtszahlen zu Grunde gelegt.

solchem Falle diese Reaction bei dem aus der Mutterlauge dargestellten Leucinpräparat ausgeblieben sein. Doch kann das Rohleucin recht wohl eine sehr geringe Menge von Amidovaleriansäure enthalten haben; denn es fehlen die Mittel, eine solche neben Leucin nachzuweisen. Eine irgendwie erhebliche Verunreinigung des Leucins durch Phenylalanin würde sich beim Erhitzen der Leucinpräparate im Glasröhrchen zu erkennen gegeben haben; es trat dabei aber keine für das Vorhandensein von Phenylalanin sprechende Erscheinung ein. Für die Prüfung auf diese Amidosäure kann ihre Eigenschaft, bei der Oxydation durch Chromsäure Benzoesäure zu geben, verworther werden. Ein Versuch, durch Oxydation eines aus den Mutterlaugen von den Leucinkrystallisationen erhaltenen Produkts Benzoesäure zu gewinnen, gab ein negatives Resultat; doch war dieser Versuch wegen eines dabei gemachten Fehlers nicht einwurfsfrei. Gesetzt aber, dass das negative Ergebniss ein correctes gewesen wäre, so würde man aus demselben doch nicht auf gänzlichliches Fehlen von Phenylalanin in den untersuchten Keimpflanzen schliessen können. Denn es kann kein Zweifel darüber bestehen, dass es mir nicht gelungen ist, die in diesen Keimpflanzen enthaltenen Amidosäuren vollständig zu gewinnen. Nach dem Auskrystallisiren des Rohleucins aus dem bezüglichen Extract blieb, wie oben schon erwähnt worden ist, eine starke dickflüssige Mutterlauge übrig, welche neben Kohlenhydraten (Zucker) noch Stickstoffverbindungen enthielt. In dieser Mutterlauge können Amidovaleriansäure und Phenylalanin, falls sie in sehr geringer Quantität das Leucin begleiteten, vollständig in Lösung geblieben sein. Dass in dieser dickflüssigen Mutterlauge ohne Zweifel auch ein, vielleicht recht beträchtlicher Theil des Leucins zurückgeblieben ist, wurde oben gleichfalls schon hervorgehoben.

Bei der Darstellung der Amidosäuren nach dem von mir beschriebenen Verfahren aus Keimpflanzen geringen Alters beobachtete ich stets das Entstehen solcher dickflüssigen Mutterlaugen, welche entweder bei wochenlangem Stehen keine Ausscheidungen mehr lieferten oder doch der Gewinnung

etwa entstehender Ausscheidungen unüberwindlichen Widerstand entgegensetzten. Anders ist es bei der Verarbeitung von Keimpflanzen, welche mehrere Wochen lang im Dunklen vegetirt haben; hier bilden sich solche Mutterlaugen meistens in viel geringerer Stärke. Man darf wohl annehmen, dass in letzterem Falle das Ausrückstallisiren der Amidosäuren weit vollständiger stattfindet.

Die Stoffe, von denen bisher die Rede war, wurden aus dem weingeistigen Keimpflanzenextract dargestellt. Den bei einmaliger Behandlung der Keimpflanzen mit Weingeist gebliebenen Rückstand untersuchte ich auf Hexonbasen. Ich behandelte 1 kg dieses Rückstandes mit kaltem Wasser, befreite den wässrigen Auszug von den durch Gerbsäure und durch Bleiessig fällbaren Substanzen, säuerte ihn sodann mit Schwefelsäure an und fügte nun Phosphorwolframsäure¹⁾ zu. Der durch dieses Reagens hervorgebrachte Niederschlag wurde abfiltrirt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, zwischen Fliesspapier stark abgepresst und sodann in bekannter Weise mit Barythydrat zerlegt. Aus der mit Hülfe von Kohlensäure vom Baryt befreiten Basenlösung konnte ich nach dem von A. Kossel angegebenen Verfahren, dessen Beschreibung hier unnöthig ist, Histidin, Arginin und Lysin isoliren. Das Histidin wurde aus dem Quecksilberchloridniederschlag als salzsaures Salz gewonnen. Dieses Salz bildete glänzende Krystalle, die im Aussehen dem Histidinchlorid anderer Herkunft glichen. Das durch Umsetzung mit Silbernitrat daraus dargestellte Histidinnitrat lieferte, als seiner wässerigen Lösung überschüssiges Silbernitrat und dann tropfenweise Ammoniakflüssigkeit zugesetzt wurde, einen weissen amorphen Niederschlag von Histidinsilber.²⁾ Die Bestimmung des Silber-

1) Sowohl in diesem Falle wie in allen später beschriebenen Versuchen wurde krystallisirte, nach Drechsel's Verfahren durch Auflösen in Aether gereinigte Phosphorwolframsäure verwendet.

2) Es sei hier daran erinnert, dass eine wässerige Lösung von Argininnitrat mit Silbernitrat und Ammoniak keine Fällung gibt; das Entstehen jenes Niederschlags unterscheidet also das Histidin vom Arginin.

gehalts in der bei 100° getrockneten Substanz gab folgendes Resultat:

0,1600 g Substanz gaben 0,0890 g Ag.	
Berechnet für $C_6H_{14}Ag_2N_4O_2 + H_2O$	Gefunden
Ag 55,77	55,62%.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber, sodann mittelst Silbernitrat von der Salzsäure befreit; hierauf wurde es mit Silbernitrat und Barytwasser versetzt, um das Arginin als Silberverbindung auszufällen. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, zwischen Fliesspapier abgepresst, sodann in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber engte ich im Wasserbade stark ein, nachdem es mit Salpetersäure neutralisirt worden war; es lieferte bald Krystalle von Argininnitrat. Letztere wurden durch Aufstreichen auf eine Thonplatte von der nur in geringer Quantität vorhandenen Mutterlauge befreit, einmal aus Wasser umkrystallisirt und sodann in bekannter Weise¹⁾ in Argininkupfernitrat = $(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3 H_2O$ übergeführt. Diese charakteristische Argininverbindung, welche aus mässig concentrirter wässeriger Lösung in dünnen, zu kugligen Aggregaten vereinigten Prismen von charakteristischem Aussehen krystallisirt, schmolz gleichzeitig mit einer aus anderer Quelle stammenden Probe der gleichen Verbindung bei 112°²⁾ und lieferte bei der Analyse folgende Zahlen:

1) 0,3290 g der an der Luft, dann noch kurze Zeit über Chlorcalcium getrockneten Substanz verloren bei 100—105° 0,0310 g an Gewicht und gaben beim Glühen 0,0440 g CuO.

2) 0,4090 g Substanz, ebenso behandelt, verloren 0,0382 g an Gewicht und gaben 0,0550 g CuO.

Berechnet für	Gefunden	
$(C_6H_{14}N_4O_2)_2Cu(NO_3)_2 + 3 H_2O$	1	2
H ₂ O 9,15	9,42	9,34%
Cu 10,77	10,69	10,74%

1) Vgl. diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 48, sowie Bd. XXII, S. 428.

2) Fast den gleichen Schmelzpunkt (112—114°) gibt A. Gulewitsch (diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 197) für das Kupferargininnitrat an.

Das durch Zerlegung dieser Verbindung mittelst Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat gab die Reactionen des Arginin-nitrats.¹⁾

Das Filtrat von dem durch Silbernitrat und Barytwasser hervorgebrachten Niederschlage wurde von den darin noch vorhandenen Silber- und Barytresten befreit und sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt. Die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Basenlösung wurde mit alkoholischer Pikrinsäurelösung neutralisirt und dann im Wasserbade stark eingeeengt. Sie lieferte eine krystallinische Ausscheidung, welche aus einem Gemenge von Kaliumpikrat mit dem Pikrat einer organischen Base bestand. Ich führte diese Pikrate durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether in bekannter Weise in die Chloride über. Die wässrige Lösung der letzteren wurde im Wasserbade eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt; Chlorkalium blieb zurück, während das Chlorhydrat einer organischen Base in Lösung ging. Nachdem das beim Verdunsten dieser Lösung zurückgebliebene Salz zur Reinigung noch einmal in Methylalkohol aufgenommen worden war, wurde seine concentrirte wässrige Lösung mit Platinchlorid und etwas Weingeist vermischt. Eine dabei in geringer Quantität entstandene Fällung wurde abfiltrirt, das Filtrat mit mehr Weingeist vermischt und nun der Ruhe überlassen. Nach ca. 12 Stunden begann ein Chloroplatinat in schönen rothgelben Prismen aus der Flüssigkeit sich abzuscheiden. Die Prismen zeigten genau das gleiche Aussehen, wie Lysinplatinchloridkrystalle,²⁾ verwitterten ebenso wie diese sehr rasch beim Liegen über concentrirter Schwefelsäure und besaßen den gleichen Schmelzpunkt.³⁾ Die Analyse der

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 438.

2) Als Vergleichsobject diente das Chloroplatinat von Lysin, welches aus den Spaltungsprodukten der aus Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen von uns isolirt worden war.

3) Bei Ausführung des Versuchs wurden zwei Capillarröhrchen, von denen das eine etwas Lysinplatinchlorid, das zweite eine Probe des auf seine Identität mit letzterem zu prüfenden Chloroplatinats enthielt,

zuerst im Exsiccator, dann bei 100°, schliesslich noch bei 120° getrockneten Krystalle gab folgende Resultate:

1) 0,1735 g Substanz gaben beim Glühen 0,0807 g Pt.

2) 0,4170 g Substanz wurden in Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Schwefelplatin durch Glühen in Platin übergeführt, das Filtrat vom Schwefelplatin für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl's Methode verwendet; erhalten wurden 0,1455 g Pt und 0,01963 g N.

Berechnet für		Gefunden	
$C_5H_{14}N_2O_8$, 2 HCl, PtCl ₄		1	2
Pt	35,05	34,98	34,89%
N	5,05	—	4,71%

Die Ausbeute an Hexonbasen war nicht gross; aus 1 kg des Ausgangsmaterials erhielt ich ungefähr 0,4 g Histidinchlorid, 1,5 g Argininnitrat und 0,4 g Lysinchlorid. Doch können diese Angaben selbstverständlich auf Genauigkeit keinen Anspruch machen, denn nach dem Auskrystallisiren des Histidinchlorids blieb eine starke Mutterlauge übrig, die ohne Zweifel noch etwas von jenem Salz einschloss; ferner sind Argininnitrat und Lysinchlorid nicht in reinem Zustand gewogen worden. Es muss demnach auch als möglich bezeichnet werden, dass neben jenen drei Stickstoffverbindungen noch andere organische Basen sich vorfanden.

Was den Asparagingehalt dieser Keimpflanzen betrifft, so lieferte ein wässeriger Auszug aus 10 g lufttrockener Keimpflanzen 0,184 g Asparaginkrystalle (wasser- und aschenfrei in Rechnung gestellt) = 1,84%. Doch ist es nicht sicher, dass nicht den Krystallen etwas Leucin beigemischt war. Ich versuchte daher noch aus einem Extract aus 40 g lufttrockener Keimpflanzen das Asparagin durch Ausfällung mit Mercurinitrat u. s. w. nach bekannter Methode möglichst vollständig zu gewinnen; dabei erhielt ich 0,642 g Asparaginkrystalle (wasser- und aschenfrei in Rechnung gestellt) = 1,6%. Weit höher, nämlich = 4,2 % war die Asparaginmenge, die sich

gleichzeitig im gleichen Bade erhitzt (das Schmelzen erfolgte bei 218—220°). In der gleichen Weise sind alle später in dieser Abhandlung aufgeführten Schmelzpunktsbestimmungen, die zur Identifizirung von Lysinplatinchlorid dienten, ausgeführt worden.

Chlorkalium ein in Methylalkohol lösliches, krystallisirbares Chlorhydrat enthielt. Dass hier Lysinchlorid vorlag, darf für wahrscheinlich erklärt werden.

Der Asparagingehalt der lufttrockenen Pflänzchen belief sich nach einer nach Sachsse's Methode ausgeführten Bestimmung auf 4,6%; die aus den Pflänzchen abscheidbare Asparaginmenge war aber hier noch geringer, als bei den Pflänzchen der ersten Cultur. Ich führe die betreffende Zahl hier nicht an, weil sie vielleicht mit einem Fehler behaftet ist und wegen Mangels an Material nicht durch einen zweiten Versuch kontrollirt werden konnte; es muss aber doch als möglich bezeichnet werden, dass die nach Sachsse's Methode erhaltene Zahl um ein Beträchtliches zu hoch ist.

In diesen Pflänzchen wurden auch der Gesamtstickstoff und die auf Proteinstoffe fallende Stickstoffmenge, letztere nach Stutzer's Methode, bestimmt. Für die lufttrockenen Pflänzchen ergaben sich folgende Werthe¹:

Gesamtstickstoff	4,80%
Stickstoff in Proteinstoffen	3,22%.

Auf nicht proteinartige Verbindungen fällt nach diesen Bestimmungen 1,58% N = 32,9% des Gesamtstickstoffs.

Da der Wassergehalt der lufttrockenen Pflänzchen 9,18% betrug, so berechnen sich für die Pflanzentrockensubstanz folgende Werthe:

Gesamtstickstoff	5,29%
Stickstoff in Proteinstoffen	3,55%
Stickstoff in nicht proteinartigen Verbindungen . .	1,74%.

Dass ich schliesslich noch eine dritte Cultur 6—7tägiger Keimpflanzen von *Vicia sativa* untersucht habe, hatte einen besonderen Grund. Wie man aus den im «Anhang» gemachten Mittheilungen ersehen kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass

1) Analytische Belege: A. Gesamtstickstoff: a) 1,2101 g Substanz gaben 0,058326 g = 4,82% N. b) 1,4138 g Substanz gaben 0,0674383 g = 4,77% N (Mittel: 4,80% N). B. Proteinstickstoff nach Stutzer's Verfahren: a) 1,3594 g Substanz gaben 0,043534 g = 3,20% N. b) 1,3370 g Substanz gaben 0,043264 g = 3,24% N (Mittel 3,22% N). Die Bestimmungen wurden nach Kjeldahl's Methode ausgeführt.

die Keimpflanzen der Papilionaceen ein eiweisslösendes Enzym enthalten. Es liegt nun im Bereich der Möglichkeit, dass dieses Enzym noch während des bei 55—60° erfolgenden Trocknens der Pflänzchen auf die Eiweissstoffe wirkte. Allerdings kann die Wirkung wohl nur eine schwache gewesen sein, denn, abgesehen davon, dass jene Temperatur vermuthlich keine günstige für das Enzym war, entwich auch aus den im Trockenschrank dünn ausgebreiteten Pflänzchen das Wasser so rasch, dass Vorgänge der genannten Art ohne Zweifel bald zum Stillstand kamen. Immerhin war es von Interesse, zu prüfen, ob andere Resultate sich ergaben, wenn das Trocknen der Pflänzchen bei einer höheren Temperatur erfolgte. Daher wurden die Pflänzchen der dritten Cultur, welche, ebenso wie diejenigen der zweiten Cultur, im verdunkelten Zimmer gezogen worden waren und ungefähr den gleichen Entwicklungsgrad besaßen, bei 75—80° getrocknet. Sie bräunten sich beim Trocknen stärker, als die Pflänzchen, die bei einer unter 60° liegenden Temperatur getrocknet wurden; die bei ihrer Untersuchung erhaltenen Resultate stimmten aber in allen wesentlichen Punkten mit denjenigen überein, die sich bei der Untersuchung der anderen Pflänzchen gleicher Art ergaben. Ein weingeistiger Extract aus 1 kg der lufttrockenen Pflänzchen lieferte ein Amidosäurepräparat, dessen Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure 5½ g betrug. Das Präparat schloss eine sehr kleine Menge von Tyrosin ein; der Rest bestand allem Anschein nach zum allergrössten Theil aus Leucin. Nach zweimaligem Umkrystallisiren aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit bestand die Substanz aus weissen, glänzenden Krystallblättchen, die das Aussehen und das Verhalten des Leucins zeigten. Ihre heisse, wässerige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat in reichlicher Menge eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Die Kupferbestimmung gab für dieses Produkt folgendes Resultat:

0,6287 g Substanz (bei 100° getrocknet)	gaben	0,1545 g CuO.
Berechnet für $(C_6H_{11}NO_2)_2Cu$		Gefunden
Cu 19,66		19,68 %.

17*

Der bei Behandlung der zerriebenen Pflänzchen mit Wein-
geist verbliebene Rückstand wurde mit kaltem Wasser extrahirt.
Der Auszug gab mit Phosphorwolframsäure¹⁾ einen starken Nieder-
schlag, aus welchem sich nach bekannten Methoden Hexon-
basen isoliren liessen. Das aus dem Quecksilberchloridnieder-
schlage gewonnene Histidinchlorid bildete tafelförmige
Krystalle, die im Aussehen dem Histidinchlorid anderer Her-
kunft glichen. In dem durch Umkrystallisiren gereinigten Produkt
wurde eine Chlorbestimmung mit folgendem Resultat ausgeführt:

0,1035 g Substanz (über Schwefelsäure getrocknet) gaben 0,0695 g AgCl.

Berechnet für	Gefunden
$C_6H_9N_3O_3 \cdot HCl + H_2O$	
Cl 16,90	16,61 %.

Die Silberbestimmung in dem aus diesem Produkt nach
bekanntem Verfahren dargestellten Histidinsilber gab
folgendes Resultat:

0,1590 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,0890 g Ag.

Berechnet für	Gefunden
$C_6H_9Ag_2N_3O_3 + H_2O$	
Ag 55,77	56,0 %.

Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage
wurde das Arginin in früher beschriebener Weise durch
Fällung mit Silbernitrat und Barytwasser isolirt. Ich führte
diese Base zunächst in das Nitrat über.²⁾ Letzteres wurde
durch Umkrystallisiren gereinigt und dann in Argininkupfer-
nitrat übergeführt. Diese Verbindung krystallisirte in der
charakteristischen Form und schmolz gleichzeitig mit Arginin-
kupfernitrat anderer Herkunft. Die Analyse gab folgende
Resultate:

0,2720 g Substanz verloren bei 100—105° 0,0255 g an Gewicht
und gaben 0,0860 g CuO.

Berechnet für	Gefunden
$(C_6H_{14}N_4O_3)_2 \cdot Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$	
H ₂ O 9,15	9,38 %.
Cu 10,77	10,57 %.

1) Vor dem Zusatz der Phosphorwolframsäure wurde der Auszug
von den durch Gerbsäure und durch Bleiessig fällbaren Stoffen befreit.

2) Nach dem Auskrystallisiren des Argininnitrats blieb eine starke,
dickflüssige Mutterlange übrig.

Das bei Zerlegung dieser Kupferverbindung mittelst Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat stimmte im Aussehen und in den Reactionen vollständig mit Argininnitrat überein.

Das Filtrat von dem durch Silbernitrat und Baryt hervorgebrachten argininhaltigen Niederschlage enthielt noch eine durch Phosphorwolframsäure fällbare Base. Es ist also sehr wohl möglich, dass auch hier Lysin sich vorfand; doch habe ich den Versuch nicht bis zur Isolirung dieser Base durchgeführt.

Aus den im Vorigen gemachten Mittheilungen ist zu ersehen, dass die drei Culturen 6—7tägiger Keimpflanzen, von denen die eine im Freien in fruchtbarer Erde, die beiden anderen im Zimmer in Sand gezogen waren, bei der Untersuchung die gleichen Resultate gaben; aus allen liessen sich Leucin, Tyrosin, Arginin und Histidin isoliren (die Prüfung auf Lysin ist nur bei den Pflänzchen der ersten Cultur, hier aber mit positivem Resultat, ausgeführt worden). Auch die Ausbeute an den oben genannten Stoffen zeigte bei den drei zur Untersuchung gelangten Culturen nur geringe Verschiedenheiten.

Die bei 75—80° getrockneten Pflänzchen der dritten Cultur lieferten, soweit sich dies auf dem von mir eingeschlagenen Wege überhaupt feststellen liess, keine niedrigere Ausbeute an Eiweisszersetzungsprodukten (Amidosäuren und Hexonbasen), als die unter 60° getrockneten Pflänzchen der beiden anderen Culturen; also scheint es keinen Einfluss auszuüben, ob man in der einen oder in der anderen Weise die Pflänzchen trocknet.

b) 3 $\frac{1}{2}$ wöchentliche etiolirte Keimpflanzen.

Die fein zerriebenen lufttrockenen Pflänzchen, im Gewicht von 550 g, wurden mit kochendem Weingeist von ca. 92 Volumprocenten behandelt; der Auszug, in früher beschriebener Weise verarbeitet, lieferte ein Amidosäurenpräparat, dessen Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure nur 2 g betrug. Dieses Präparat, aus welchem ich Tyrosin nicht zu isoliren vermochte, wurde zwei Mal aus einem Gemisch

von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt; dann wurde seine wässerige Lösung mit Kupferoxydhydrat erhitzt, wobei eine Kupferverbindung sich ausschied. Bei der Zersetzung durch Schwefelwasserstoff lieferte diese Verbindung eine Substanz, die sich beim Erhitzen in Glasröhrchen wie ein Gemenge von Phenylalanin und Leucin verhielt (während ein Theil sublimirte, blieb ein geschmolzener, nach dem Erkalten krystallinisch erstarrender Rückstand, während im oberen Theile des Glasröhrchens ölige Tropfen sich absetzten, die nach dem Erkalten krystallinisch wurden und dann den Geruch besaßen, der den Zersetzungsprodukten des Phenylalanins eigenthümlich ist). Als diese Substanz der Oxydation mit Kaliumbichromat und verdünnter Schwefelsäure unterworfen wurde, trat der Geruch des Benzaldehyds auf; aus der erkalteten Flüssigkeit schied sich eine in Aussehen und Verhalten der Benzoesäure gleichende Substanz aus.¹⁾ Diese Erscheinungen sprechen dafür, dass Phenylalanin vorhanden war. Die von der erwähnten Kupferverbindung abfiltrirte Flüssigkeit wurde im Wasserbade eingedunstet, der Verdampfungsrückstand sodann mit warmem Wasser behandelt, wobei noch eine geringe Menge einer schwer löslichen Kupferverbindung zurückblieb. Die filtrirte Lösung wurde mit Hülfe von Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und hierauf eingedunstet, der Verdampfungsrückstand aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt. So erhielt ich ein in glänzenden Blättchen krystallisirendes Produkt, welches das Verhalten der Amidovaleriansäure zeigte. Es verflüchtigte sich beim Erhitzen im Glasröhrchen unter Bildung eines weissen Sublimats; seine wässerige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupferacetat keine Ausscheidung. Es löste sich leicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung.

Aus den im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnissen ist zu schliessen, dass in dem bei Verarbeitung der 3 1/2 wöchent-

¹⁾ Die in Wasser schwer lösliche Substanz krystallisirte in glänzenden Nadeln und Blättchen, welche beim Erhitzen schmolzen, später sublimirten und den Geruch der Benzoesäure zeigten. Die neutralisirte Lösung gab mit Eisenchlorid eine hellbraune Fällung.

lichen Pflänzchen erhaltenen Amidosäurenpräparat Phenylalanin und Amidovaleriansäure enthalten waren; dass neben letzteren auch Leucin sich vorfand, ist nicht bewiesen, kann jedoch für möglich erklärt werden. Jedenfalls aber bestand nur ein Theil, wahrscheinlich sogar nur ein kleiner Theil jenes Präparats aus Leucin. Daraus folgt aber, dass die 3¹/₂wöchentlichen Keimpflanzen nur sehr wenig Leucin enthielten.

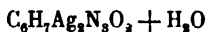
In Uebereinstimmung damit stehen die Resultate, die ich früher bei Untersuchungen von 3wöchentlichen etiolirten Keimpflanzen von *Vicia sativa* erhielt. Aus diesen Keimpflanzen konnte ich, bei Verarbeitung weit grösserer Materialmengen, Phenylalanin, Amidovaleriansäure und Leucin darstellen. Von diesen drei Körpern schien die Amidovaleriansäure der Quantität nach zu prävaliren, während Leucin allem Anschein nach nicht in grosser Menge vorhanden war. Aus diesen Keimpflanzen erhielt ich pro Kilogramm ungefähr 3 g Amidosäuren (gewogen als Rohprodukt); es ist anzunehmen, dass höchstens ein Drittel dieses Rohproduktes aus Leucin bestand. Demnach würde ein Kilogramm der lufttrockenen Pflänzchen nur ungefähr 1 g Leucin geliefert haben.

Der bei der Behandlung mit kochendem Weingeist ungelöst gebliebene Theil der 3¹/₂wöchentlichen Keimpflanzen wurde mit Wasser extrahirt, der Auszug nach bekanntem Verfahren auf Hexonbasen untersucht. Die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Basenlösung versetzte ich, nachdem sie mit Kohlensäure gesättigt worden war, mit Quecksilberchlorid bis zur neutralen Reaction. Der dabei entstandene Niederschlag lieferte, in bekannter Weise verarbeitet, Krystalle von Histidinchlorid in geringer Menge. Das daraus dargestellte Histidinsilber gab bei der Analyse folgendes Resultat:

0,2020 g Substanz, bei 100° getrocknet, gaben 0,1125 g Ag.

Berechnet für:

Gefunden:



Ag 55,77

55,69%

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag wurde

vom Quecksilber und von der Salzsäure befreit und sodann zur Ausfällung des Arginins mit Silbernitrat und Barytwasser versetzt. Den dabei erhaltenen braunen Niederschlag zersetzte ich durch Schwefelwasserstoff, neutralisirte die vom Schwefelsilber abfiltrirte Flüssigkeit mit Salpetersäure und dunstete sie sodann zum dünnen Syrup ein. Dieser Syrup lieferte keine Krystalle von Argininnitrat. Er enthielt noch eine durch Silbernitrat und Ammoniak fällbare Substanz (Histidin?); ich fällte dieselbe aus, befreite das Filtrat vom Silber und vom Ammoniak und versetzte es dann mit Phosphorwolframsäure. Der durch dieses Reagens hervorgebrachte, an Quantität nur geringe Niederschlag wurde durch Barythydrat zerlegt, die so erhaltene Basenlösung mit Salpetersäure neutralisirt und sodann wieder eingedunstet. Auch diese Flüssigkeit lieferte keine Argininnitrat-Krystalle¹⁾. Ich vermochte also aus den 3¹/₂ wöchentlichen Keimpflanzen kein Arginin darzustellen. Zu dem gleichen Resultat bin ich früher, jedoch unter Anwendung einer weniger scharfen Trennungsmethode, bei Untersuchung der 3wöchentlichen Keimpflanzen gelangt.

Man kann nun noch fragen, ob etwa in den weingeistigen Keimpflanzen-Extracten Arginin sich vorgefunden habe. Indessen habe ich bei Untersuchung argininhaltiger Keimpflanzen das Arginin bis jetzt stets in den in Weingeist unlöslichen Theile der Pflänzchen gefunden. Ferner habe ich früher auch den Niederschlag, der durch Phosphorwolframsäure in der wässerigen Lösung des beim Verdunsten der weingeistigen Extracte verbliebenen Rückstandes erzeugt wurde, eingehend untersucht; ich vermochte aus diesem Niederschlag Guanidin, Cholin, Betain und eine geringe Menge Vicin zu isoliren, während dagegen kein Anzeichen für das gleichzeitige Vorhandensein von Arginin mir entgegen trat.

Die 3¹/₂ wöchentlichen Keimpflanzen enthielten Aspa-

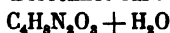
¹⁾ Eine Probe der Flüssigkeit gab mit Kaliumquecksilberjodid und Natronlauge eine Fällung; Arginin kann also in sehr kleiner Menge vorhanden gewesen sein.

ragin in sehr grosser Quantität. Ein wässeriger Extract aus 20 g lufttrockener Pflänzchen lieferte 1,762 g Asparaginkristalle (wasser- und aschenfrei in Rechnung gestellt) = 8,9%. Nachdem dieses Produkt aus wenig heissem Wasser umkrystallisiert worden war, wurde darin eine Krystallwasserbestimmung mit folgendem Resultat ausgeführt:

0,693 g Substanz verloren bei 100—105° 0,083 g an Gewicht.

Berechnet für:

Gefunden:



H₂O 12,00

11,98%

Die Identität der Krystalle mit Asparagin ergibt sich ferner daraus, dass sie beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure sich unter Ammoniakabspaltung zersetzten und dass aus ihrer, in der Wärme mit Kupferoxydhydrat gesättigten wässrigen Lösung beim Erkalten eine blaue, dem Asparaginkupfer gleichende Verbindung sich ausschied.

Nach Sachsse's Methode wurde der Asparagingehalt dieser Keimpflanzen = 12,4% gefunden. Wahrscheinlich ist diese Zahl in Folge des Vorhandenseins von Glutamin zu hoch.

Sodann wurden in den Keimpflanzen noch der Gesamtstickstoff und die auf Proteinstoffe fallende Stickstoffmenge nach Stutzer's Methode bestimmt. Für die lufttrockenen Pflänzchen ergeben sich folgende Zahlen:¹⁾

Gesamtstickstoff 6,60 %

Stickstoff in Proteinstoffen. 2,08 %

Auf nichtproteinartige Verbindungen fielen demnach 4,52% N oder 68,2% des Gesamtstickstoffes. Da der Wassergehalt der lufttrockenen Pflänzchen 6,98% betrug, so ergeben sich für die Trockensubstanz der Pflänzchen folgende Gehaltszahlen:

¹⁾ Analytische Belege: A) Gesamtstickstoff: a) 1,0691 g Substanz gaben 0,0703468 g = 6,58% N; b) 1,1999 g Substanz gaben 0,0792948 g = 6,61% N (Mittel 6,60% N). B) Proteinstickstoff nach Stutzer's Verfahren: a) 1,1955 g Substanz gaben 0,0246064 g = 2,06% N; b) 1,1188 g Substanz gaben 0,0234948 g = 2,10% N (Mittel 2,08% N). Die Bestimmungen wurden nach Kjeldahl's Methode ausgeführt.

Gesamtstickstoff	7,10 %
Stickstoff in Proteinstoffen.	2,24 %
„ „ nicht proteinartigen Verbindungen	4,86 %

Nimmt man an, dass die in den Pflänzchen sich vorfindende absolute Stickstoffmenge während des Keimungsvorganges keine Aenderung erfahren hat, so ergibt die Berechnung, dass aus 100 Gewichtstheilen 6—7tägiger Keimpflanzen 74,5 Gewichtstheile $3\frac{1}{2}$ wöchentlicher Pflänzchen entstanden sind. Jene Keimpflanzen würden danach während $2\frac{1}{2}$ wöchentlichen Wachstums im Dunkeln einen Gewichtsverlust von 25,5 Theilen erlitten haben.

Rückblick auf die an den Keimpflanzen von *Vicia sativa* gemachten Beobachtungen.

In den 6—7tägigen Keimpflanzen findet man (neben Asparagin) Leucin, Tyrosin und Hexonbasen vor; und zwar treten diese Produkte in einem Mengenverhältniss auf, das demjenigen ähnlich ist, in welchem man sie bei der Zersetzung pflanzlicher Eiweissstoffe durch Säuren erhält; Tyrosin findet sich in viel kleinerer Quantität als Leucin, unter den Hexonbasen prävalirt das Arginin, keine dieser Hexonbasen tritt aber in so grosser Menge auf, wie das Leucin.

Eine ganz andere Zusammensetzung zeigt das Gemenge löslicher Stickstoffverbindungen, das in den 3- oder $3\frac{1}{2}$ wöchentlichen etiolirten Keimpflanzen enthalten ist. Tyrosin und Arginin fehlen darin oder sind nur in Spuren vorhanden, Leucin tritt nur in kleiner Quantität auf, daneben finden sich noch zwei Amidosäuren, die aus den jüngeren Keimpflanzen nicht dargestellt werden konnten, aber doch vielleicht darin nicht völlig fehlen, nämlich Phenylalanin und Amidovaleriansäure. Asparagin tritt in den älteren etiolirten Pflanzen in viel grösserer Quantität auf, als in den jüngeren Pflänzchen; die Ausbeute an diesem Amid war dort fünf Mal so gross, wie hier. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Pflänzchen ist also eine sehr starke Verschiebung des Mengenverhältnisses, in welchem das Asparagin zum Arginin, Leucin und Tyrosin steht, verbunden. Vergleicht man z. B. die Aus-

beuten an Asparagin und Leucin, so findet man, dass die Asparaginmenge zur Leucinmenge bei den jüngeren Pflänzchen sich etwa = 3 bis 4 : 1, in den älteren Pflänzchen dagegen vielleicht = 80 bis 90 : 1 verhält.

Diese Erscheinungen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Anhäufung des Asparagins in den Pflänzchen von einem Verbrauch anderer Produkte des Eiweissumsatzes, insbesondere des Arginins, Tyrosins und Leucins begleitet ist.

Bemerkenswerth ist noch, dass mir bei Untersuchung der 6—7tägigen Keimpflanzen das aus den ungekeimten Wickensamen leicht darstellbare Vicin nicht begegnet ist. Dagegen fand ich diesen Stoff früher in den 3wöchentlichen Keimpflanzen, und zwar in dem Phosphorwolframsäureniederschlag aus dem in Weingeist löslichen Theil der Pflänzchen (bei den 6—7tägigen Pflänzchen habe ich diesen Niederschlag nicht untersucht). Die Quantität des Vicins war aber hier nur eine sehr geringe, woraus man zu schliessen hat, dass diese Stickstoffverbindung im Stoffwechsel der Keimpflanzen dem Verbrauch unterliegt.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Keimpflanzen von *Vicia sativa* ausser den aus ihnen dargestellten nicht proteinartigen Stickstoffverbindungen noch andere Stoffe dieser Art enthalten, die uns bis jetzt unbekannt geblieben sind. Denn die 3 $\frac{1}{2}$ wöchentlichen etiolirten Pflänzchen enthalten 4,52 % Stickstoff in Form nicht proteinartiger Verbindungen. Da nun auf Asparagin und ähnliche Stoffe (Glutamin) 2,64 % Stickstoff fallen, so bleiben noch 1,88 % Stickstoff übrig, welche anderen nicht proteinartigen Verbindungen angehören. Sind nun auch in diesen Keimpflanzen neben Asparagin noch zahlreiche Stoffe jener Art, nämlich Leucin, Amidovaleriansäure, Phenylalanin, Histidin, Guanidin, Cholin, Betain, Vicin und Ammoniak nachgewiesen worden, so findet man doch keinen dieser Stoffe in den Keimpflanzen in grosser Menge vor; es scheint daher, dass die genannten Stoffe nicht hinreichen, um die Stickstoffmenge zu decken, die nach Abzug des Asparagin- und Glutamin-Stickstoffs vom « Nichtproteinstickstoff » noch übrig bleibt. Etwas Bestimmtes lässt sich darüber frei-

lich nicht aussagen, weil es an Methoden zur quantitativen Bestimmung jener Stickstoffverbindungen fehlt.

B. Versuche mit *Pisum sativum*.

Die von mir untersuchten Keimpflanzen von *Pisum sativum* waren 6—7 Tage alt; sie waren in einem verdunkelten Zimmer in Sand gezogen. Die Pflänzchen der einen Cultur, gewachsen bei einer Temperatur von 20—22° C., besaßen ohne Wurzeln eine Länge von 8—9 cm.; sie wurden in gewöhnlicher Weise getrocknet. Die Pflänzchen der zweiten Kultur, gewachsen bei nur 17—19° C., hatten nicht ganz die gleiche Länge erreicht; sie wurden nach der Erndte in Alkohol geworfen und nach längerem Verweilen unter letzterem in gelinder Wärme (20—25° C.) getrocknet.

Zunächst theile ich die Resultate mit, die ich bei Untersuchung der Pflänzchen der ersten Cultur erhielt. Diese Resultate stimmten fast vollständig mit denjenigen überein, die bei Untersuchung der 6—7tägigen Keimpflanzen von *Vicia sativa* erhalten wurden. Ein weingeistiger Auszug aus 900 g der zerkleinerten luftgetrockneten Pflänzchen lieferte ein Amidosäurenpräparat, dessen Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure 4,5 g betrug. Dieses Präparat schloss etwas Tyrosin ein, dessen Isolirung und Identificirung eben so geschah, wie es bei den Keimpflanzen von *Vicia* beschrieben worden ist. Der Rest des Präparates bestand offenbar zum allergrössten Theile aus Leucin; er bildete nach zweimaligem Umkrystallisiren aus Weingeist unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit glänzende Blättchen, welche im Aussehen und Verhalten mit Leucin vollkommen übereinstimmten. Ihre heisse, wässrige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine Ausscheidung von Leucinkupfer in reichlicher Menge. Die Analyse des bei 100° C. getrockneten Produkts gab folgende Zahlen:

1. 0,2540 g Substanz gaben 0,0625 g CuO
2. 0,2600 „ „ 0,0635 „ „
3. 0,2875 g „ „ nach Kjeldahl's Methode 0,024012 g N.

Berechnet für:		Gefunden:		
$(C_6H_9NO)_2Cu$		1	2	3
Cu	19,66	19,66	19,52	— %
N	8,67	—	—	8,36

Die Mutterlauge von dieser Leucin-Krystallisation lieferte ein Produkt, welches gleichfalls Aussehen und Verhalten des Leucins zeigte; aus seiner wässerigen Lösung schied sich beim Erhitzen mit Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Kupferverbindung aus.

Die beim Verdunsten der letzten Mutterlauge erhaltene Substanz wurde der Oxydation mittelst Kaliumbichromat und Schwefelsäure unterworfen; dabei erhielt ich Benzoesäure in kleiner Menge (2—3 cg.). Durch Umkrystallisiren und durch Sublimation gereinigt, schmolz dieselbe bei $119,5^{\circ}C.$ ¹⁾ Aus dem Entstehen von Benzoesäure darf man wohl schliessen, dass die Mutterlauge vom Leucin eine kleine Menge von Phenylalanin enthält.

In den bei Behandlung der zerkleinerten Keimpflanzen mit heissem Weingeist verbliebenen Rückstand liessen sich Hexonbasen nachweisen. Ich extrahirte 600 g dieses Rückstandes mit schwach erwärmtem Wasser und verarbeitete den Auszug so, wie es oben bei den Keimpflanzen von Vicia angegeben worden ist. Eine kleine Verschiedenheit lag nur in der Art und Weise, in welcher ich das lysinhaltige Filtrat von dem durch Silbernitrat und Barytwasser erzeugten Niederschlage behandelte. Ich fügte diesem Filtrat zur Entfernung des darin noch vorhandenen Silbers Salzsäure zu; dann neutralisirte ich es mit Kalilauge und dünstete es auf ein geringes Volumen ein. Nach dem Erkalten schieden sich anorganische Salze aus. Die nach Entfernung derselben verbliebene Flüssigkeit wurde, um den grössten Theil des Kalis zu entfernen, mit Weinsäure und wenig Weingeist vermischt. Aus der durch Filtration vom Weinstein getrennten Flüssigkeit wurde durch Schwefelsäure der darin noch vorhandene Baryt entfernt; dann wurde Phosphorwolframsäure zugesetzt. Den durch dieses

¹⁾ Die Substanz zeigte auch im Uebrigen das Verhalten der Benzoesäure.

Reagens erzeugten Niederschlag zerlegte ich mit Barythydrat in bekannter Weise. Die dabei erhaltene Basenlösung wurde mit alkoholischer Pikrinsäurelösung neutralisirt, das in dieser Weise erhaltene Pikrat dann ebenso behandelt, wie es früher angegeben worden ist.

Die Identificirung der Hexonbasen geschah in der gleichen Weise, wie bei den aus den Vicia-Keimpflanzen dargestellten Produkten gleicher Art. In dem krystallisirten Histidinchlorid wurde eine Chlorbestimmung ausgeführt; die dabei gefundene Zahl entspricht dem von der Formel des Monochlorhydrats geforderten Werth, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:

0,1220 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0,0840 g AgCl.

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_9N_3O_3, HCl + H_2O$	
Cl	17,00 %.
16,90	

In dem aus dem salzsauren Salz in bekannter Weise dargestellten Histidinsilber wurde eine Silberbestimmung mit folgendem Resultat ausgeführt:

0,2000 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,1115 g Ag.

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_7AgN_3O_3 + H_2O$	
Ag	55,75 %.
55,77	

Das Arginin wurde, wie oben erwähnt ist, zunächst in Form des Nitrats erhalten, das jedoch noch unrein war. Dasselbe wurde in das Argininkupfernitrat übergeführt, welches in der charakteristischen Form, nämlich in kugeligen, aus dünnen Prismen bestehenden Agregaten von dunkelblauer Farbe, krystallisirte. Die Krystalle schmolzen gleichzeitig mit einem Argininkupfernitratpräparat anderer Herkunft (bei 112 bis 113°). Die Bestimmung des Kupfergehalts der Verbindung gab folgendes Resultat:

0,1785 g der über Chlorcalcium getrockneten Substanz gaben 0,0245 g CuO.

Berechnet für:	Gefunden:
$(C_6H_{14}N_4O_3)_2 Cu(NO_3)_2 + 3 H_2O$	
Cu	10,96 %.
10,77	

Das bei Zerlegung der Kupferverbindung durch Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat besass das Aussehen des reinen

Argininnitrats und gab die für letzteres charakteristischen Reactionen.

Das Lysin wurde in früher schon beschriebener Weise in das Chloroplatinat übergeführt; letzteres schied sich aus der mit Weingeist vermischten wässerigen Lösung in rothgelben Prismen aus, welche fast gleichzeitig mit einem als Vergleichsobject dienenden Lysinplatinchloridpräparat anderer Herkunft schmolzen. In dem bei 120° getrockneten Salze wurde der Platingehalt mit folgendem Resultat bestimmt:

1.	0,1968 g Substanz gaben	0,0690 g Pt	
2.	0,2720 „ „ „	0,0940 „ „	
	Berechnet für:	Gefunden:	
	$C_6H_{14}N_2O_6, 2 HCl, PtCl_4$	1	2
Pt	35,05	35,00	34,56 %.

Was die Ausbeute an Hexonbasen betrifft, so lieferten 600 g des lufttrocknen Ausgangsmaterials ungefähr 1,0 g Argininnitrat, 0,20 g Histidinchlorid und 0,50 g Lysinchlorid. Doch können diese Angaben schon deshalb nur als approximative gelten, weil einerseits die genannten Produkte nicht in reinem Zustande gewogen wurden, andererseits aber nicht ganz unbeträchtliche Antheile derselben in den Mutterlaugen verblieben sein können. Die Ausbeute an Amidosäuren (Rohprodukt) betrug 4,5 g aus 900 g lufttrockner Keimpflanzen; dass dieses Rohprodukt zum grössten Theil aus Leucin bestand, kann nicht zweifelhaft sein. Da die zerriebenen Keimpflanzen nur einmal mit Weingeist extrahirt worden sind, so ist anzunehmen, dass die Amidosäuren nicht vollständig in Lösung gegangen sind (man vergl. die darüber bei den Vicia-Keimpflanzen gemachten Erfahrungen).

Die Pflänzchen der zweiten Cultur wurden bis auf einen, ca. $\frac{1}{5}$ vom Gewicht der ganzen Ernte betragenden Rest, über dessen Verwendung weiter unten Angaben folgen, in Weingeist geworfen und, nach längerem Verweilen unter letzterem, vom weingeistigen Auszug getrennt und bei gelinder Wärme (20—25°) getrocknet; dann wurden sie fein zerrieben. Aus einem bei Behandlung dieses Materials mit kochendem Weingeist erhaltenen Extract liess sich Leucin isoliren. Zuerst

aus Wasser, dann aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt, bildete es glänzende Blättchen, die beim Erhitzen in Glasröhrchen sowie beim Versetzen ihrer heissen, wässerigen Lösung mit Kupferacetat sich wie Leucin verhielten. Auch der beim Uebergiessen der Keimpflanzen mit kaltem Weingeist entstandene Auszug (vgl. oben) enthielt allem Anschein nach Leucin; doch standen der Isolirung des letzteren Schwierigkeiten entgegen, wahrscheinlich darauf beruhend, dass dieser Auszug auch viel Kohlenhydrat enthielt.

Der in heissem Weingeist unlösliche Theil der getrockneten Pflänzchen wurde mit Wasser extrahirt, der Auszug in der früher schon beschriebenen Weise auf Hexonbasen untersucht. Letztere liessen sich ohne Schwierigkeit nachweisen. Ueber ihre Identificirung ist Folgendes anzugeben: Das aus dem Quecksilberchloridniederschlag gewonnene krystallisirte Histidinchlorid besass das gewöhnliche Aussehen; es wurde daraus in bekannter Weise Histidinsilber dargestellt. Die Silberbestimmung in dieser Verbindung gab folgendes Resultat:

0,1950 g Substanz (bei 100° getrocknet) gaben 0,1085 g Ag.

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_7Ag_2N_3O_8 + H_2O$	
Ag	55,69 %.
55,77	

Das Arginin wurde in das Argininkupfernitrat übergeführt. Diese Verbindung krystallisirte aus der wässerigen Lösung in der gewöhnlichen Form und schmolz gleichzeitig mit Argininkupfernitrat anderer Herkunft. Die Kupferbestimmung im lufttrocknen Salz gab folgendes Resultat:

0,1890 g Substanz gaben 0,0250 g CuO.

Berechnet für:	Gefunden:
$(C_6H_{14}N_4O_7)_2 Cu(NO_3)_2 + 3 H_2O$	
Cu	10,57 %.
10,77	

Das bei Zerlegung der Kupferverbindung mittelst Schwefelwasserstoff erhaltene Niträt stimmte im Aussehen und in den Reactionen mit Argininniträt vollständig überein.

Was den Nachweis des Lysins betrifft, so habe ich mich darauf beschränkt, zu constatiren, dass neben Arginin und Histidin noch eine Base vorhanden war, deren Chloroplatinat

im Aussehen und im Schmelzpunkt mit Lysinplatinchlorid übereinstimmte.

Die Ausbeute an Hexonbasen war ungefähr so gross, wie aus den Keimpflanzen der ersten Cultur.

Wie schon oben erwähnt worden ist, wurde von den Pflänzchen der zweiten Cultur ein Theil (ca. $\frac{1}{5}$ des ganzen Quantum) nicht mit Alkohol übergossen, sondern in anderer Weise behandelt. Diese Pflänzchen wurden in die Cotyledonen und die übrigen Theile zerlegt, dann bei 50—60° getrocknet, zerrieben und mit Wasser extrahirt. Aus den Extracten suchte ich das Asparagin möglichst vollständig zu gewinnen, indem ich dasselbe durch Mercurinitrat ausfällte und aus den Niederschlägen in bekannter Weise isolirte. Die Cotyledonen lieferten nur ca. 0,1%, die übrigen Theile dagegen 2,0% Krystalle. Daraus geht hervor, dass hier ebenso wie in den Lupinus-Keimpflanzen das Asparagin in den Cotyledonen in weit geringerer Quantität enthalten ist, als in den übrigen Pflanzentheilen. Den aus den Cotyledonen erhaltenen Krystallen war etwas Tyrosin beigemischt. Auch in einem zweiten, in der gleichen Weise ausgeführten Versuch lieferten die Cotyledonen Tyrosin; und zwar erhielt ich aus 80 g des lufttrocknen Materials 0,03 g der genannten Amidosäure.¹⁾ Demnach enthielten auch die Pflänzchen dieser zweiten Cultur von *Pisum sativum* Tyrosin; und zwar fand sich dasselbe in den Cotyledonen der Pflänzchen vor, während ich es aus den übrigen Pflanzentheilen nicht zu isoliren vermochte.

Es sind hier nun noch die Resultate mitzuthellen, die ich bei Untersuchung der ungekeimten Erbsen-Samen auf Amidosäuren und Hexonbasen erhielt. Ein Kilogramm der fein gepulverten Samen wurde mit kochendem Weingeist von ca. 92 Volumprocent extrahirt, der Auszug dann ganz ebenso behandelt, wie es bei den Keimpflanzen geschah. Ich erhielt eine syrupöse Flüssigkeit, aus welcher ich auch nicht die geringste Menge von Amidosäuren zu isoliren vermochte.

¹⁾ Die Substanz gab die Hoffmann'sche und die Piria'sche Tyrosin-Reaction; sie löste sich leicht in Ammoniakflüssigkeit und schied sich beim Verdunsten der Lösung in der gewöhnlichen Form aus.

Von dem in Weingeist unlöslichen Theil der Samen wurden ca. 600 g mit schwach erwärmtem Wasser extrahirt, der Auszug sodann in bekannter Weise auf Hexonbasen untersucht. Dabei erhielt ich nur einen kleinen Phosphorwolframsäureniederschlag. Die bei Zerlegung dieses Niederschlags mit Barytwasser erhaltene Basenlösung gab mit Quecksilberchlorid nur eine schwache Trübung; Histidin konnte darin also nur in Spuren enthalten sein. Die vom Quecksilberchlorid-Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit wurde sodann nach Kossel's Verfahren auf Arginin geprüft. Der durch Silbernitrat und Baryt erhaltene braune Niederschlag lieferte bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff eine Flüssigkeit, die zur Neutralisation nur weniger Tropfen verdünnter Salpetersäure bedurfte. Beim Einengen dieser Flüssigkeit im Wasserbade erhielt ich eine sehr geringe Quantität eines Syrups, welcher auch bei wochenlangem Stehen keine Krystalle absetzte. Ich vermochte also aus dem Extract weder Histidin noch Arginin zu isoliren. Der zuletzt erwähnte Syrup gab mit Kaliumquecksilberjodid und Natronlauge in geringer Menge eine weisse Fällung, wie sie die Argininverbindungen geben; es ist also möglich, dass dieser Syrup Arginin in Spuren enthielt.

C. Versuche mit *Lupinus albus*.

Nachdem E. Belzung¹⁾ in 8tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* Leucin in reichlicher Menge gefunden hatte, habe ich Keimpflanzen der gleichen *Lupinus*-Art mehrmals untersucht. Zuerst experimentirte ich²⁾ mit 10tägigen Pflänzchen, welche im Zimmer bei ziemlich schwacher Beleuchtung in Sand bei einer Temperatur von 22—23° gewachsen waren. Aus den Axenorganen dieser Pflänzchen — aus denjenigen Theilen also, die ich bis dahin bei den *Lupinus*-Keimpflanzen besonders reich an Amidosäuren gefunden hatte — suchte ich Leucin darzustellen, konnte aber nur Phenylalanin und

¹⁾ Annales des sciences naturelles, 7^e série, Botanique, T. XV, p. 203.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 313—317.

Amidovaleriansäure isoliren. Später untersuchte ich¹⁾ die Axenorgane 2¹/₂ wöchentlicher etiolirter Keimpflanzen; auch aus diesen konnte ich nur Phenylalanin und Amidovaleriansäure isoliren. Dagegen erhielt ich Leucin neben Amidovaleriansäure aus den Axenorganen 14 tägiger im Freien in Sand gewachsener Keimpflanzen.²⁾ Auch aus den Cotyledonen dieser letzteren Pflanzen konnte ich Amidosäuren (wahrscheinlich ein Gemenge von Leucin und Amidovaleriansäure) darstellen. Das an diesen normalen Keimpflanzen erhaltene Resultat bestätigt also die Angabe Belzung's über das Vorkommen von Leucin bei *Lupinus albus*.

Die Cotyledonen der 2¹/₂ wöchentlichen etiolirten Keimpflanzen untersuchte ich auf Arginin, und zwar nach demjenigen Verfahren, das mir zum Nachweis dieser Base in anderen Objecten gedient hatte. Ich erhielt jedoch ein ganz negatives Resultat. Da es möglich ist, dass bei Anwendung dieses Verfahrens kleine Argininmengen dem Nachweis entgehen, so benutzte ich zur Prüfung auf Arginin später noch die schärfere Methode, die wir den Forschungen Kossel's verdanken. Als Object verwendete ich 14 tägige normale Keimpflanzen von *Lupinus albus*, die in fruchtbarer Erde gewachsen waren. Ein Extract aus 200 g der lufttrocknen Cotyledonen und 200 g der lufttrocknen Stengel wurde in der in dieser Abhandlung wiederholt schon beschriebenen Methode verarbeitet. Aus der bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags durch Baryt erhaltenen Basenlösung suchte ich zunächst durch Fällung mit Quecksilberchlorid Histidin zu gewinnen, erhielt dabei aber nur eine ganz schwache Trübung. Aus der filtrirten Flüssigkeit wurden das Quecksilber und die Salzsäure entfernt; dann suchte ich durch Fällung mit Silbernitrat und Barytwasser Arginin zur Abscheidung zu bringen. Die bei Zerlegung des braunen Niederschlags mit Hülfe von

1) Ebendasselbst, Bd. XXII, S. 421—424.

2) Es muss hier bemerkt werden, dass diese Pflänzchen, obwohl sie ein Alter von 14 Tagen besaßen, doch nicht weit entwickelt waren; sie waren, wahrscheinlich in Folge der Temperaturverhältnisse, langsam gewachsen und hatten nur je ein Blättchenpaar entwickelt.

Schwefelwasserstoff erhaltene, schwach alkalisch reagierende Flüssigkeit wurde mit Salpetersäure neutralisirt und nun im Wasserbade auf ein ganz kleines Volumen eingengt. Sie lieferte auch bei längerem Stehen keine Krystalle von Arginin-nitrat. Nach den Reactionen, welche diese Flüssigkeit gab, enthielt sie eine geringe Menge von organischen Basen; doch waren die Reactionen nicht solcher Art, dass auf das Vorhandensein von Arginin geschlossen werden konnte. Diese Base fehlte also in dem untersuchten Object entweder vollständig, oder war doch nur in minimaler Menge vorhanden.

Es war nun festzustellen, welche Stickstoffverbindungen sich bei *Lupinus albus* in Keimpflanzen von geringerem Alter finden. Auf meine Veranlassung untersuchte N. Wassilieff¹⁾ in meinem Laboratorium 6—7tägige Keimpflanzen, welche in Flusssand im Zimmer bei ziemlich schwacher Beleuchtung gezogen worden waren. Aus den Cotyledonen dieser Pflänzchen liessen sich Asparagin, Leucin, Tyrosin, Arginin und Histidin darstellen (das Vorhandensein von Lysin wurde wenigstens wahrscheinlich gemacht); die übrigen Theile (Axenorgane) der Pflänzchen lieferten Asparagin und Leucin; auch Amidovaleriansäure und Phenylalanin schienen vorhanden zu sein (das Amidosäure-Gemenge lieferte bei der Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure eine kleine Quantität von Benzoesäure). Von den Amidosäuren war Leucin in grösster Menge vorhanden (die Cotyledonen lieferten fast $\frac{1}{2}\%$ Roh-Leucin). Tyrosin liess sich nur in sehr kleiner Quantität gewinnen. Die Ausbeute an Arginin betrug ungefähr 0,3% der Cotyledonen-Trockensubstanz.

Später habe ich noch 6tägige im Freien in fruchtbarer Erde gezogene Keimpflanzen der gleichen *Lupinus*-Art untersucht, welche einem noch etwas jüngeren Vegetationsstadium angehörten, als die von Wassilieff untersuchten Pflänzchen; bei denselben betrug das Trockengewicht der Cotyledonen fast vier Mal so viel, als dasjenige der übrigen Pflanzen-

¹⁾ Eine ausführliche Mittheilung über diese Untersuchung wird von N. Wassilieff in den «Landwirthsch. Versuchsstationen» veröffentlicht werden.

theile.¹⁾ Von den lufttrocknen fein zerriebenen Cotyledonen wurde ein Quantum von ca. 600 g einmal mit Weingeist von ca. 92 Volumprocent ausgekocht. Der weingeistige Auszug lieferte ungefähr $2\frac{1}{2}$ g Amidosäuren (Rohprodukt, über Schwefelsäure getrocknet). Beim Auflösen dieses Produktes in einem Gemisch von kochendem Alkohol und etwas Ammoniakflüssigkeit blieb ein in diesem Lösungsmittel schwer löslicher Rückstand, der sich auch in kaltem Wasser nur wenig löste; sein Gewicht betrug nach der Behandlung mit kaltem Wasser fast 0,1 g. Er erwies sich als Tyrosin. Er löste sich leicht in wässriger Ammoniakflüssigkeit. Die Lösung lieferte beim Verdunsten feine Krystallnadeln. Die Substanz gab sowohl die Hoffmann'sche als die Piria'sche Tyrosin-Reaction. Die vom Tyrosin abfiltrirte weingeistig-ammoniakalische Lösung wurde über Schwefelsäure gestellt, bis das Ammoniak sich verflüchtigt hatte, die in der Flüssigkeit ausgeschiedene Substanz sodann noch einmal aus einem Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt. Das Produkt zeigte nun Aussehen und Verhalten des Leucins. Es verflüchtigte sich im Glasröhrchen unter Bildung eines weissen wolligen Sublimats; seine wässrige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung, deren Kupfergehalt der Formel dieser Kupferverbindung entsprach, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:

1. 0,1610 g Substanz gaben 0,0394 g CuO.

2. 0,1970 „ „ „ 0,0485 „ „

Berechnet für:

Gefunden:

$(C_6H_{11}NO_2)_2Cu$

1

2

Cu 19,66

19,56

19,66%

Den bei einmaliger Extraction der gepulverten Keimpflanzen mit Weingeist verbliebenen Rückstand untersuchte auf meinen Wunsch Hr. Dr. S. Posternak in meinem Laboratorium auf Hexonbasen. Jener Rückstand wurde mit Wasser extrahirt, der Auszug nach Entfernung der durch Gerbsäure

¹⁾ Bei den von Wassilieff untersuchten Pflänzchen verhielt sich dagegen das Trockengewicht der Cotyledonen zu demjenigen der übrigen Theile ungefähr = 60 : 40.

und Bleiessig fällbaren Stoffe mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch erzeugte Niederschlag mit Barythydrat zerlegt. Aus dem Niederschlage, welcher in der zuvor mit Kohlensäure gesättigten Basenlösung durch Quecksilberchlorid hervorgebracht wurde, liess sich eine im Aussehen dem Histidinchlorid gleichende Substanz in Krystallen isoliren. Das aus diesem Chlorid durch Umsetzung mittelst Silbernitrat erhaltene Nitrat gab mit Silbernitrat und Ammoniak eine weisse, dem Histidinsilber gleichende Fällung. Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage wurde, nach Entfernung des Quecksilbers und der Salzsäure, das Arginin durch Silbernitrat und Barytwasser gefällt; es wurde später in bekannter Weise in das Argininkupfernitrat übergeführt, welches aus der wässrigen Lösung in der gewöhnlichen Form (in kugligen, aus dünnen Prismen bestehenden, dunkelblauen Aggregaten) krystallisirte. Der Schmelzpunkt dieser Krystalle stimmte mit demjenigen des Argininkupfernitrats anderer Herkunft überein. Die nach Entfernung des Histidins und des Arginins noch übrig gebliebenen Basen wurden durch Pikrinsäure ausgefällt. Die Pikrate zerlegte man in drei Fractionen. Die erste Fraction bestand aus harten gelben Krystallen, die zweite aus ähnlichen Krystallen, denen jedoch bräunlich rothe Krystallaggregate beigemischt waren; diese beiden Fractionen lieferten bei der Verarbeitung kein dem Lysinplatinchlorid gleichendes Chloroplatinat. Die dritte Fraction bildete einen Syrup, der sich auf Zusatz von absolutem Alkohol in einen Krystallbrei verwandelte. Das durch Aufstreichen auf eine Thonplatte von der Mutterlauge befreite und sodann aus Wasser umkrystallisirte Produkt bestand aus hellgelben, zarten Blättchen. Es wurde durch Schütteln mit Salzsäure und Aether zerlegt. Die wässrige Lösung lieferte beim Verdunsten ein Chlorhydrat, das sich im Methylalkohol unter Hinterlassung eines geringen Rückstandes löste. Die wässrige Lösung dieses Chlorhydrats wurde mit Platinchlorid und absolutem Alkohol versetzt, wobei ein an Quantität sehr geringer Niederschlag sich ausschied. Aus der davon abfiltrirten Lösung schieden sich nach mehrtägigem Stehen 1 cm. lange, rothgelbe, pris-

matische Krystalle aus, die im Aussehen mit Lysinplatinchlorid übereinstimmten. Sie schmolzen gleichzeitig mit einer Probe von Lysinplatinchlorid. Daraus ist zu schliessen, dass die dritte Fraction der Pikrate aus Lysinpikrat bestand.

Die Ausbeute an Argininnitrat aus 600 g lufttrockner Cotyledonen betrug ca. 1,8 g.; Histidin und Lysin wurden nur in sehr kleinen Quantitäten erhalten.

Die nach dem Abtrennen der Cotyledonen übrig gebliebenen Theile dieser Keimpflanzen wurden nur auf Amidosäuren untersucht. Ein mit kochendem 92%igen Weingeist hergestellter Auszug aus 350 g des luftgetrockneten Materials lieferte ca. 2 g Amidosäure (Rohprodukt). Letztere wurden dreimal aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit, dann noch einmal aus verdünntem Weingeist umkrystallisirt. Das so erhaltene Produkt bestand aus weissen, glänzenden Krystallblättchen und zeigte das Verhalten der Amidovaleriansäure; es verflüchtete sich beim Erhitzen im Glasröhrchen unter Bildung eines weissen Sublimats; seine wässerige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupfernitrat keine Ausscheidung. Zur Darstellung einer Kupferverbindung wurde die wässerige Lösung der Krystalle in der Wärme mit Kupferoxydhydrat gesättigt, dann filtrirt und im Wasserbade eingeeengt, wobei die Kupferverbindung sich in blauen Krystallen ausschied. Die Kupferbestimmung gab ein Resultat, welches der Annahme entspricht, dass amidovaleriansaures Kupfer vorlag:

0,1545 g Substanz (bei 100—105° getrocknet) geben 0,0412 g CuO

Berechnet für: Gefunden:

$(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$

Cu 21,49

21,30 %.

Es ist möglich, dass neben Amidovaleriansäure im Rohprodukt auch etwas Leucin sich vorfand und dass dasselbe beim Umkrystallisiren jenes Produktes in die Mutterlaugen überging. Für das Vorhandensein einer geringen Menge von Phenylalanin scheint der Umstand zu sprechen, dass die beim Eindunsten der Mutterlaugen erhaltene Substanz bei der Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure eine Flüssigkeit lieferte, aus welcher beim Verdunsten einige im Aussehen der

Benzoessäure gleichende, schwer lösliche Krystallblättchen sich ausschieden.

Wie aus den im Vorigen gemachten Mittheilungen zu ersehen ist, lieferten die beiden Culturen 6—7 tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus*, von denen die eine im Zimmer in Sand, die zweite im Freien in fruchtbarer Erde gezogen war, bei der Untersuchung im Wesentlichen die gleichen Resultate. In den Cotyledonen fanden sich (neben Asparagin) Leucin, Tyrosin und Hexonbasen vor; die übrigen Pflanzentheile lieferten ein Amidosäuren-Gemenge, in welchem neben Amidovaleriansäure wahrscheinlich Leucin und Phenylalanin vorhanden waren.

D. Versuche mit *Lupinus luteus*.

Etiolirte 2—3 wöchentliche Keimpflanzen von *Lupinus luteus* sind, wie aus unseren Abhandlungen zu ersehen ist, wiederholt von uns untersucht worden. Neben Asparagin fanden wir darin Arginin in beträchtlicher Menge, später auch Histidin und Lysin,¹⁾ ferner Phenylalanin und Amidovaleriansäure. Leucin und Tyrosin fehlten in solchen Keimpflanzen wahrscheinlich nicht ganz vollständig, doch gelang es nicht, sie daraus zu isoliren — abgesehen davon, dass ich einmal aus den Cotyledonen in sehr geringer Quantität eine Substanz erhielt, deren Identität mit Leucin wenigstens für wahrscheinlich erklärt werden konnte.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die Resultate von Beobachtungen, die ich an ganz jungen Keimpflanzen der gleichen *Lupinus*-Art machte. Aus den Cotyledonen von 6tägigen Pflänzchen konnte ich leicht Leucin isoliren, aus den Cotyledonen von nur wenig älteren Pflänzchen Leucin und Tyrosin.²⁾ Amidovaleriansäure und Phenylalanin erhielt ich dagegen nicht aus diesen Cotyledonen; doch schien man auf das Vorhandensein einer sehr geringen Quantität der zuletzt genannten Amidosäure aus der Thatsache schliessen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 465.

²⁾ Ebendasselbst, Bd. XXIV, S. 106—108.

zu können, dass wenigstens in meinem Falle das Amidosäuren-Gemenge bei der Oxydation ein wenig Benzoessäure lieferte.

Es schien mir wünschenswerth, ganz junge Keimpflanzen von *Lupinus luteus* noch einmal, und zwar noch vollständiger, auf ihre stickstoffhaltigen Bestandtheile zu untersuchen und zum Vergleich ältere Pflänzchen, welche unter Benutzung des gleichen Samens und unter ganz gleichen Versuchsbedingungen gezogen waren, in Untersuchung zu nehmen. Ich verfolgte dabei insbesondere noch den Zweck, einen vollständigeren Ueberblick über die Vertheilung der krystallisirbaren Stickstoffverbindungen auf die verschiedenen Theile der Pflänzchen zu gewinnen.

Die Keimpflanzen, die mir als Material für diese Untersuchung gedient haben, wurden in einem verdunkelten Zimmer in Flusssand bei einer Temperatur von 18—20° C. gezogen. Sie wurden theils nach 6—7tägiger, theils nach 14—15tägiger Vegetationsdauer geerntet. Die Cotyledonen und die übrigen Theile der Pflänzchen wurden getrennt untersucht.

a) 6—7tägige Keimpflanzen.

Diese Keimpflanzen hatten sich rasch entwickelt, wie daraus hervorgeht, dass trotz ihres geringen Alters das Trockengewicht ihrer Cotyledonen sich zum Trockengewicht der übrigen Theile wie 100 : 63 verhielt.

Wir behandelten 270 g der getrockneten und dann fein zerriebenen Cotyledonen mit kochendem Weingeist von ca. 92 Volumprocent. Den durch Filtration und Nachwaschen mit Weingeist vom Ungelösten getrennten Auszug verarbeitete ich in bekannter Weise auf Amidosäuren. Das dabei erhaltene Präparat, dessen Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure 1,60 g betrug, wurde zweimal aus einem Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt. Es zeigte nun Aussehen und Verhalten des Leucins. Beim Erhitzen im Glasröhrchen verflüchtigte es sich unter Bildung eines weissen wolligen Sublimats; es löste sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung; in wässriger Lösung mit

Kupferacetat erhitzt, lieferte es eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Wie aus weiter oben schon gemachten Mittheilungen hervorgeht, ist aus diesen Erscheinungen zu schliessen, dass die vorliegende Substanz Leucin war und dass letzterem Amidovaleriansäure und Phenylalanin höchstens in Spuren beigemischt sein konnten. Wäre Amidovaleriansäure in erheblicher Menge vorhanden gewesen, so würde das Präparat mit Kupferacetat keine Ausscheidung von Leucinkupfer gegeben haben; eine erhebliche Beimischung von Phenylalanin hätte sich beim Erhitzen der Substanz im Röhrchen zu erkennen gegeben. Das Rohprodukt schloss aber wahrscheinlich eine ganz kleine Menge von Phenylalanin ein; denn die aus den Mutterlaugen von den Leucinkrystallen beim Verdunsten gewonnene Substanz lieferte bei der Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure in sehr geringer Quantität ein Produkt, welches Aussehen und Verhalten der Benzoesäure zeigte.

Aus den Cotyledonen der einwöchentlichen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* konnte ich also auch in diesem Falle ebenso wie in zwei früher von mir beschriebenen Versuchen,¹⁾ Leucin isoliren. Tyrosin, welches in einem der früheren Versuche neben Leucin in geringer Menge isolirt werden konnte, vermochte ich in diesem Falle nicht zu gewinnen; doch gab das Rohleucin mit Millon'schem Reagens Tyrosin-Reaction. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass die Isolirung von Tyrosin gelungen wäre, wenn ich, statt 270 g, ein grösseres Quantum von Cotyledonen hätte verarbeiten können.

Den bei der Behandlung mit heissem Weingeist ungelöst gebliebenen Theil der Cotyledonen extrahirte ich mit heissem Wasser. Aus dem durch Eindunsten auf ein geringes Volumen gebrachten Auszug krystallisirte Asparagin; ich erhielt davon 11,9 g (wasserfrei in Rechnung gestellt) = 4,4 % der luft-trockenen Cotyledonen. Die von den Krystallen getrennte Mutterlauge wurde mit Wasser verdünnt, von den durch Gerb-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 106—108.

säure und durch Bleiessig fällbaren Stoffen befreit und sodann mit Mercurinitrat versetzt. Den durch dieses Reagens hervor-gebrachten Niederschlag zersetzte ich, nach dem Abfiltriren und Auswaschen, durch Schwefelwasserstoff, befreite die vom Schwefelquecksilber abfiltrirte Flüssigkeit von Schwefelwasserstoff und fügte ihr dann Phosphorwolframsäure zu. Der durch letztere erzeugte Niederschlag wurde in bekannter Weise verarbeitet. Aus der dabei erhaltenen Basenlösung konnte ich Histidin und Arginin isoliren (auf Lysin wurde nicht geprüft). Das Histidin wurde durch Fällung mit Quecksilberchlorid aus der mit Kohlensäure gesättigten Basenlösung zur Abscheidung gebracht und durch eine von Herrn Prof. U. Grubenmann auf meine Bitte ausgeführte krystallographische Untersuchung des salzsauren Salzes identificirt. Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag entfernte ich das Quecksilber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, sodann die Salzsäure durch Zusatz von Silbernitrat; das Filtrat wurde mit Salpetersäure genau neutralisirt und nun zum dünnen Syrup eingedunstet. Aus letzterem krystallisirte bald Argininnitrat; ich erhielt davon $2\frac{1}{2}$ g. Es wurde durch Erhitzen seiner wässerigen Lösung mit Kupferoxydhydrat in die Kupferverbindung übergeführt, welche in den charakteristischen, aus feinen dunkelblauen Prismen bestehenden, kugligen Aggregaten krystallisirte. Zur Identificirung des Arginins analytische Bestimmungen auszuführen, erschien in diesem Falle nicht nöthig.

Später habe ich noch die Cotyledonen einer zweiten, nur wenig älteren Cultur solcher Pflänzchen auf Hexonbasen untersucht. Auch dieses Material wurde zunächst mit kochendem Weingeist behandelt, der dabei verbliebene Rückstand sodann mit Wasser extrahirt. Die Verarbeitung dieses Auszuges und die Trennung der darin enthaltenen Hexonbasen geschah so, wie es oben bei Beschreibung der an *Vicia sativa* und *Pisum sativum* angestellten Versuche angegeben worden ist. Der Quecksilberchloridniederschlag lieferte Krystalle von Histidinchlorid, in denen eine Chlorbestimmung mit folgendem Resultat ausgeführt wurde:

0,1590 g Substanz gaben 0,1065 g AgCl.

Berechnet für :	Gefunden :
$C_6H_9N_3O_3, HCl + H_2O$	
Cl 16,90	16,56 %.

Das nach bekannter Methode daraus dargestellte Histidinsilber gab bei der Analyse folgendes Resultat :

0,2078 g Substanz (bei 100 ° getrocknet) gaben 0,1428 g Ag.

Berechnet für :	Gefunden :
$C_6H_7Ag_2N_3O_3 + H_2O$	
Ag 55,77	55,67 %.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag lieferte Arginin in bedeutender Menge; letzteres wurde zunächst in das Nitrat, dann in die Kupfernitratverbindung übergeführt; diese Verbindung krystallisierte aus der wässerigen Lösung in der gewöhnlichen Form.

Das Lysin wurde durch Pikrinsäure gefällt, aus dem Pikrat sodann durch Schütteln mit Salzsäure und Aether in das Chlorhydrat übergeführt. Letzteres löste ich zur Reinigung in Methylalkohol. Das beim Verdunsten der so gewonnenen Lösung zurückbleibende Salz war indessen noch kein reines Lysinchlorid. Doch gelang es, daraus ein dem Lysinplatinchlorid gleichendes Chloroplatinat darzustellen. Letzteres schied sich aus der mit viel Weingeist versetzten wässerigen Lösung¹⁾ in rothgelben Prismen aus, welche gleichzeitig mit einer Probe vom Lysinplatinchlorid schmolzen. Die Platinbestimmung in der zuerst bei 100 °, dann bei 125 ° getrockneten Substanz gab folgendes Resultat :

0,2078 g Substanz gaben 0,0723 g Pt.	
Berechnet für :	Gefunden :
$C_6H_{14}N_4O_6, 2HCl, PtCl_4$	
Pt 35,00	34,79 %.

Die Ausbeute an Arginin war in diesem Falle ungefähr doppelt so gross, wie in dem vorher beschriebenen Versuch; Histidin und Lysin erhielt ich nur in kleinen Quantitäten.

Die nach dem Abtrennen der Cotyledonen übrig gebliebenen Theile der Keimpflanzen, im Gewicht von 170 g

¹⁾ Ein beim Vermischen der wässerigen Lösung mit Weingeist sofort sich ausscheidendes Chloroplatinat wurde durch Filtration entfernt.

(lufttrocken) wurden mit heissem Weingeist von ca. 92 Volumprocent behandelt, der Auszug in bekannter Weise auf Amidosäuren verarbeitet. Aus dem dabei erhaltenen Präparat, dessen Gewicht nach dem Trocknen über Schwefelsäure $2\frac{1}{4}$ g betrug, konnte ich diejenigen Amidosäuren isoliren, die ich stets auch aus den älteren etiolirten Keimpflanzen von *Lupinus luteus* erhalten habe, nämlich Phenylalanin und Amidovaleriansäure. Die Trennung und Reinigung derselben geschah nach dem wiederholt von mir beschriebenen Verfahren. Das Phenylalanin krystallisirte, wie bei früheren Darstellungen, aus einer concentrirten Lösung in der Wärme in glänzenden Blättchen, aus verdünnten Lösungen in weissen feinen Prismen, es zeigte beim Erhitzen im Glasröhrchen das charakteristische, von mir wiederholt beschriebene Verhalten (Bildung von Phenyläthylamin und Phenyllactimid); auch habe ich constatirt, dass es beim Erhitzen mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure Benzoesäure lieferte. Die Amidovaleriansäure bildete nach mehrmaligem Umkrystallisiren kleine glänzende Blättchen, die sich beim Erhitzen im Glasröhrchen unter Bildung eines weissen Sublimats verflüchtigten; in wässriger Lösung mit Kupferacetat erhitzt, gaben sie keine Ausscheidung (Unterschied von Leucin); sie lösten sich leicht in einer gesättigten wässrigen Leucinlösung. Leucin konnte aus diesem Object nicht isolirt werden, war aber doch vielleicht in geringer Menge vorhanden.

Der in Weingeist unlösliche Theil der Axenorgane enthielt Asparagin in sehr beträchtlicher Quantität. Die Ausbeute daran betrug 19,7 % der lufttrocknen Axenorgane.

Den in Weingeist unlöslichen Theil der Axenorgane habe ich auch noch auf Arginin und Histidin untersucht, und zwar dienten mir dazu Axenorgane von zwei verschiedenen, im Alter fast gleichen Culturen; das Gewicht derselben betrug nach der Extraction mit Weingeist ungefähr 250 g. Den Extract behandelte ich in der gewöhnlichen Weise. Die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Basenlösung gab mit Quecksilberchlorid einen Niederschlag. Die bei Zerlegung dieses Niederschlags mit

Schwefelwasserstoff erhaltene Flüssigkeit gab beim Verdunsten keine Krystalle von Histidinchlorid, doch liess sich daraus eine dem Histidinsilber gleichende Verbindung darstellen. Der Silbergehalt dieser Verbindung betrug 53,6 %, während die Formel des Histidinsilbers 55,77 % Ag verlangt. Das Wahrscheinlichste ist, dass unreines Histidinsilber vorlag. Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag liess sich durch Ausfällung mit Silbernitrat und Barytwasser in sehr kleiner Menge eine Base abscheiden, deren Nitrat im Aussehen mit Argininnitrat übereinstimmte. Die daraus dargestellte Kupferverbindung glich im Aussehen dem Argininkupfernitrat, besass aber einen um 3—4° niedrigeren Schmelzpunkt. Das bei Zerlegung dieser Kupferverbindung mittelst Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat gab die Reactionen des Argininnitrats. Ich bezweifle nicht, dass die vorgefundene Base Arginin war; doch lag dasselbe offenbar nicht in ganz reinem Zustand vor. Eine Stütze für die Annahme, dass hier in der That Histidin und Arginin in kleinen Quantitäten sich vorfanden, ist auch in der Thatsache zu finden, dass in den Axenorganen der älteren Keimpflanzen gleicher Art (vgl. w. u.) diese beiden Basen bestimmt nachgewiesen werden konnten.

Wie aus den im Vorigen gemachten Angaben zu ersehen ist, vermochte ich aus den 6—7tägigen Keimpflanzen Asparagin, Leucin, Amidovaleriansäure, Phenylalanin, Arginin, Histidin und Lysin zu isoliren. Das in anderen Culturen gleicher Art nachweisbare Tyrosin war auch hier vermuthlich in sehr kleiner Menge vorhanden, denn das Rohleucin gab mit Millon'schem Reagens Tyrosinreaction. Auf die ungleiche Vertheilung der im Vorigen genannten Stickstoffverbindungen auf die Cotyledonen und die Axenorgane werde ich weiter unten noch zurückkommen.

b) 14—15 tägige Keimpflanzen.

Bei diesen Pflanzen betrug das Trockengewicht der Cotyledonen ungefähr ebenso viel als dasjenige der übrigen Pflanzentheile.

Die fein zerriebenen Cotyledonen, im Gewicht von 485 g

(lufttrocken) wurden mit kochendem Weingeist behandelt, der Extract in bekannter Weise auf Amidosäuren verarbeitet. Ich erhielt dabei nur ca. 1 g eines Präparates, welches auch etwas Asparagin einschloss. Letzteres blieb grösstentheils zurück, als das Präparat in der Wärme mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und etwas Ammoniakflüssigkeit behandelt wurde. Beim Verdunsten der filtrirten Lösung wurde ein Produkt gewonnen, welches ohne Zweifel ein Gemenge mehrerer Amidosäuren war. Eine Trennung derselben liess sich nicht ausführen, da die Quantität des Produktes nur sehr gering war, Tyrosin liess sich darin nicht nachweisen; gesetzt, dass Leucin vorhanden war, so kann doch die Menge desselben nur eine äusserst geringe sein.

Der bei der Behandlung mit heissem Weingeist ungelöst gebliebene Theil der Cotyledonen lieferte Arginin in grosser Menge; daneben wurden kleine Quantitäten von Histidin und Lysin nachgewiesen. Eine Mittheilung über diesen Theil der Versuche habe ich früher schon gemacht; ich verweise auf die betreffende Publication.¹⁾

Die nach dem Abtrennen der Cotyledonen übrig gebliebenen Pflanzentheile (hypocotyles Glied, Wurzel etc.) wurden getrocknet und fein zerrieben, sodann mit kochendem 92%igen Weingeist extrahirt. Der Auszug, gewonnen aus 475 g lufttrockenen Materials, lieferte ungefähr 10 g Amidosäuren (Rohprodukt). Dieses Produkt, aus welchem Tyrosin nicht isolirt werden konnte, wurde zweimal aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt; dann wurde seine wässrige Lösung mit Kupferoxydhydrat erhitzt, wobei eine Kupferverbindung sich ausschied. Letztere lieferte bei der Zerlegung mittelst Schwefelwasserstoff unreines Phenylalanin, welches sodann durch mehrmalige Fällung mit Kupferacetat gereinigt wurde. Es zeigte die für diese Amidosäure früher von mir angegebenen Eigenschaften. Seine Kupferverbindung bestand aus blassblauen Krystallschuppen. Eine in dieser

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 465.

Verbindung ausgeführte Kupferbestimmung gab folgendes Resultat.

0,2595 g Substanz gaben 0,0525 g CuO.

Berechnet für:

Gefunden:

$(C_9H_{11}NO_2)_2Cu$

Cu 16,23

16,17 %.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass dem Phenylalanin vor der Reinigung etwas Leucin beigemischt war; denn auch Leucin kann ja durch Kupferoxydhydrat gefällt werden, obwohl es freilich durch letzteres sowohl wie durch Kupferacetat aus unreiner Lösung schwieriger niedergeschlagen wird, als Phenylalanin. Ich versuchte daher aus den Flüssigkeiten, welche von dem reineren, durch Zusatz von Kupferacetat gefällt, Phenylalaninkupfer abfiltrirt worden waren, Leucin zu gewinnen, indem ich diese Flüssigkeiten nach Entfernung des Kupfers eindunstete und den Verdampfungsrückstand aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirte. Auf diesem Wege erhielt ich aber nur Krystalle, welche das Aussehen und das Verhalten von unreinem Phenylalanin zeigten; eine dem Leucin gleichende Substanz vermochte ich nicht zu isoliren.

Das tiefblaue Filtrat von dem Niederschlage, den ich beim Erhitzen der wässerigen Lösung des Amidosäurenpräparats mit Kupferoxydhydrat erhielt (vgl. oben), wurde im Wasserbade eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit warmem Wasser behandelt (wobei eine geringe Menge einer schwerlöslichen Kupferbindung zurückblieb), die Lösung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und hierauf eingedunstet, das so erhaltene Produkt zweimal aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt. So erhielt ich eine aus glänzenden weissen Krystallblättchen bestehende Substanz, welche das Verhalten der Amidovaleriansäure zeigte. Aus derselben stellte ich eine Kupferverbindung dar, indem ich ihre heisse wässrige Lösung in der Wärme mit Kupferoxydhydrat sättigte und sodann im Wasserbade stark einengte. Die schon während des Eindunstens in blauen Krystallen sich ausscheidende Verbindung

war ziemlich schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heissem Wasser. Die Kupferbestimmung gab in der bei 100—105° getrockneten Substanz folgendes Resultat :

0, 4440 g Substanz gaben 0,1026 g CuO.	
Berechnet für :	Gefunden :
$(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$	
Cu 21,49	20,98 %.

Wie man sieht, bleibt die gefundene Zahl etwas hinter dem Werth zurück, welcher der Formel des amidovaleriansauren Kupfers = $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$ entspricht. Wahrscheinlich war der analysirten Verbindung ein wenig Leucinkupfer (mit 19,66 % Cu) beigemengt.

Das Amidosäurepräparat wurde nun noch einmal umkrystallisirt ; dann wurde aus demselben wieder eine Kupferverbindung dargestellt. Der Kupfergehalt der letzteren entsprach nun den von der Formel des amidovaleriansauren Kupfers geforderten Werthen, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist :

1) 0,2400 g Substanz (bei 110° getrocknet) gaben 0,0650 g CuO	
2) 0,2565 „ „ „ „ „ 0,0690 „ „	
Berechnet für :	Gefunden :
$(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$	1 2
Cu 21,49	21,63 21,49 %.

Aus den Axenorganen der 14—15 tägigen Keimpflanzen konnte ich also hier, ebenso wie in früheren Versuchen, Phenylalanin und Amidovaleriansäure darstellen ; die Isolirung von Tyrosin und Leucin gelang dagegen nicht.

Der bei der Behandlung der fein zerriebenen Axenorgane mit kochendem Weingeist verbliebene Rückstand war sehr reich an Asparagin ; ein Extract aus 10 g des luftgetrocknen Rückstandes lieferte durch Krystallisation 3,503 g dieses Amides (wasserfrei und nach Abzug der beigemengten Aschenbestandtheile in Rechnung gestellt) = 25,03 %. Diesen Rückstand untersuchte ich nun noch nach bekanntem Verfahren auf das Vorhandensein von Histidin und Arginin (auf Lysin habe ich nicht geprüft). Die bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Basenlösung gab mit Quecksilberchlorid einen Niederschlag, aus welchem

Histidinchlorid in Krystallen gewonnen werden konnte. Dieses Produkt, dessen Gewicht 0,4 g betrug, wurde aus Wasser umkrystallisirt, es bildete nun farblose, tafelfartige Krystalle, die im Aussehen mit den früher von uns dargestellten Histidinchloridpräparaten vollständig übereinstimmten. In dem daraus nach bekannter Methode dargestellten Histidin-Silber wurde der Silbergehalt bestimmt, wobei folgende Resultate erhalten wurden:

1. 0,2544 g Substanz (bei 100° getrocknet)	gaben	0,1420 g Ag.;
2. 0,1765 „ „ „ „ „ „	„	0,0985 „ „
Berechnet für:		Gefunden:
$C_6H_7N_2O_2Ag_2 + H_2O$	1	2
Ag 55,77	55,82	55,81 %.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag wurde nach bekannter Methode auf Arginin verarbeitet. Die alkalische Flüssigkeit, welche bei Zerlegung des durch Silbernitrat und Barytwasser erzeugten Niederschlags mittelst Schwefelwasserstoff resultirte, wurde mit Salpetersäure neutralisirt und sodann stark eingeeengt. Sie lieferte zunächst Krystalle, die aus anorganischer Substanz bestanden; die Ausscheidung derselben wurde durch Zusatz von etwas Weingeist vollständiger gemacht. Die von diesen Krystallen abgegossene Mutterlauge lieferte eine dem Argininnitrat gleichende Krystallisation, deren Gewicht jedoch nur ungefähr 0,250 g betrug. Die daraus dargestellte Kupferverbindung schmolz gleichzeitig mit einem Argininnitratpräparat anderer Herkunft und krystallisirte in der für diese Verbindung charakteristischen Form. Das bei Zerlegung derselben mittelst Schwefelwasserstoff erhaltene Nitrat gab die gleichen Reactionen, wie das reine Argininnitrat.

Auch in den Axenorganen der 14—15tägigen Keimpflanzen liessen sich also Arginin und Histidin nachweisen (auf Lysin wurde nicht geprüft). Doch fanden sich diese beiden Basen hier nur in sehr kleinen Quantitäten vor. Was speciell die Ausbeute an Arginin betrifft, so betrug dieselbe nur ca. 1 % der Ausbeute, die aus den Cotyledonen der gleichen Keimpflanzen erhalten wurde.

Discussion der Versuchsergebnisse.

Nachdem ich im Vorigen die bei der Untersuchung von zehn Keimpflanzenculturen unmittelbar erhaltenen Ergebnisse mitgetheilt habe, gehe ich zu den Schlussfolgerungen über, die sich aus diesen Ergebnissen in Bezug auf den Eiweisszerfall und die Asparaginbildung in Keimpflanzen ableiten lassen. Es ist leicht ersichtlich, dass diese Schlussfolgerungen in Uebereinstimmung mit den Ansichten stehen, die ich über den Verlauf jener Processe in meiner ersten Abhandlung «über den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze» ausgesprochen habe; die dort für diese Ansichten beigebrachten Beweise sind aber durch die Ergebnisse der neuen Versuche sehr verstärkt worden.¹⁾

Als ich vor einer langen Reihe von Jahren mich mit dem Studium der in keimenden Pflanzensamen neben Asparagin sich vorfindenden krystallisirbaren Stickstoffverbindungen zu beschäftigen begann, untersuchte ich zunächst fast nur Keimpflanzen, welche mehrere Wochen lang bei Lichtabschluss vegetirt hatten. Warum ich so verfuhr, ist leicht zu verstehen. Es war bekannt, dass ältere etiolirte Keimpflanzen reich an Asparagin sind. Man durfte nun erwarten, dass in solchen Pflänzchen ausser Asparagin auch noch manche andere während des Keimungsvorganges entstandene Stickstoffverbindungen sich anhäufen, und dass in Folge dieser Anhäufung der Darstellung derselben keine grossen Schwierigkeiten entgegenstehen würden.

Diese Erwartung hat sich erfüllt; es gelang uns, aus solchen Keimpflanzen — neben anderen hier nicht zu erwähnenden Stoffen — Arginin, Phenylalanin, Glutamin,

1) Eine ganz kurze Mittheilung über einige Ergebnisse dieser Untersuchung habe ich in den Berichten der D. Botanischen Gesellschaft, 1900, Märzheft, veröffentlicht. Doch ist inzwischen meine Arbeit durch die Untersuchung einiger Keimpflanzenculturen noch erweitert worden; in Folge davon stimmen auch die im Folgenden gemachten Angaben über die Zahl der untersuchten Culturen nicht genau mit denjenigen überein, die sich in jener vorläufigen Mittheilung finden.

darzustellen. Ob wir alle diese Stoffe hätten isoliren können, wenn wir Keimpflanzen von geringem Alter in Untersuchung genommen hätten, muss als sehr fraglich bezeichnet werden.

Eignete sich aber der bei meinen älteren Untersuchungen eingeschlagene Weg auch zur Entdeckung der ausser Asparagin in den keimenden Samen entstehenden Stickstoffverbindungen, so war es doch nicht leicht, auf diesem Wege zugleich einen klaren Einblick in den Verlauf des mit der Keimung verbundenen Eiweisszersetzungsprocesses zu gewinnen. Die grossen Unterschiede, die zwischen verschiedenen Keimpflanzenarten in Bezug auf die Qualität der aus ihnen darstellbaren Stickstoffverbindungen sich zeigten, konnten den Gedanken entstehen lassen, dass der Eiweisszerfall in den verschiedenen Keimpflanzen in ganz ungleicher Weise erfolge. Als auffallend musste es bezeichnet werden, dass zwei bei der Zersetzung der Eiweissstoffe durch Säuren, Alkalien oder Trypsin regelmässig zum Vorschein kommende Produkte, nämlich Leucin und Tyrosin, in den etiolirten Keimpflanzen häufig fehlten oder doch nur in minimalen Quantitäten sich vorfanden, auffallend war auch in vielen solchen Keimpflanzen das Mengenverhältniss des Asparagins zu den anderen stickstoffhaltigen Produkten des Eiweissumsatzes. Freilich habe ich zur Erklärung dieses Mengenverhältnisses schon in einer der ersten Abhandlungen, die ich über den Eiweissumsatz in Keimpflanzen publicirte, die Vermuthung ausgesprochen, dass das Asparagin, wenigstens zum Theil, einer Umwandlung anderer, beim Eiweisszerfall in den Keimpflanzen gebildeter Stickstoffverbindungen seine Entstehung verdanke und demgemäss ein secundäres Produkt des Eiweissumsatzes sei; aber es bedurfte doch einer wesentlichen Erweiterung unserer Kenntnisse auf diesem Gebiete durch lange fortgesetzte Untersuchungen, um jene Hypothese bestimmter aussprechen zu können. Letzteres ist von mir in dieser Zeitschrift in der oben genannten Abhandlung geschehen. Zu den Thatfachen aber, die ich dort als Stützen für die von mir vertretenen

welche ich bei Untersuchung einiger Keimpflanzenculturen geringen Alters erhielt.

Aus den Resultaten meiner neueren Untersuchungen lässt sich viel leichter erkennen, wie der Eiweisszerfall in den Keimpflanzen verläuft. Um dies darzulegen, will ich zunächst die an 6—7tägigen Papillonaceen-Keimpflanzen von uns gemachten Beobachtungen kurz zusammenstellen, unter Hinzunahme der Ergebnisse, die ich früher schon an drei Culturen solcher Keimpflanzen erhielt. Aus allen von uns untersuchten Culturen, elf an Zahl, liess sich mit Leichtigkeit Leucin darstellen; seine Quantität war, wenn auch viel geringer als diejenige des daneben vorhandenen Asparagins, doch relativ beträchtlich. Aus neun Culturen liess sich auch Tyrosin, jedoch nur in sehr geringer Quantität, isoliren; bei den übrigen Culturen deutete das Eintreten der Tyrosinreaction mit Millon'schem Reagens auf das Vorhandensein minimaler Mengen des genannten Stoffes hin. Hexonbasen konnten aus allen darauf untersuchten Culturen, nämlich aus 3 Culturen von *Vicia sativa* und aus je 2 Culturen von *Pisum sativum*, *Lupinus albus* und *Lupinus luteus* dargestellt werden, und zwar liessen sich fast ohne Ausnahme Arginin, Histidin und Lysin¹⁾ nebeneinander nachweisen.

Aus 6—7tägigen Papilionaceen-Keimpflanzen konnten also ausser Asparagin Leucin, Tyrosin und Hexonbasen dargestellt werden — Produkte, welche auch bei der Zersetzung der Eiweissstoffe durch Säuren oder durch Trypsin regelmässig erhalten werden, nach denen man aber in den älteren Keimpflanzen häufig vergebens sucht. Es ist klar, dass zur Auffindung der primären Produkte des Eiweisszerfalls die jüngeren Keimpflanzen geeignetere Objecte sind, als die älteren; jener

1) Im Einklang mit diesem Resultat steht Belzung's Angabe über das reichliche Vorkommen von Leucin in 8tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* (*Annales des sciences naturelles*, 7^e série, Botanique, T. XV, P. 203).

2) Doch ist die Prüfung auf Lysin nicht bei allen Culturen, in denen Hexonbasen nachgewiesen wurden, ausgeführt worden.

Keimungsvorgang verbundene Eiweisszersetzung der Spaltung gleicht, welche die Eiweissstoffe durch Säuren oder durch Trypsin erleiden. Dabei ist noch von Bedeutung, dass die oben genannten Produkte in den *Lupinus*-Keimpflanzen, bei denen die Cotyledonen und die übrigen Theile getrennt untersucht wurden, sich in den Cotyledonen vorfinden, an dem Orte also, an welchem die zerfallenden Reserveeiweissstoffe sich befinden, und dass das Mengenverhältniss, in welchem jene Produkte neben einander auftreten, demjenigen nicht unähnlich ist, in welchem man sie bei der Zersetzung pflanzlicher Eiweissstoffe durch Säuren erhält.¹⁾

Ein ganz anderes Bild bieten die Resultate dar, die man bei der Untersuchung 2—3 wöchentlicher oder noch älterer etiolirter Papilionaceen-Keimpflanzen erhält. Solche Keimpflanzen sind bekanntlich ausserordentlich reich an Asparagin. Tyrosin habe ich dagegen aus ihnen bis jetzt noch niemals darstellen können. Leucin fand ich in einigen Objecten vor, doch nur in geringer Quantität; aus anderen war es nicht darstellbar. Nur aus einem solchen Object, nämlich aus den etiolirten Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, konnte ich Arginin in grosser Menge gewinnen; alle anderen von uns untersuchten älteren Papilionaceen-Keimpflanzen lieferten entweder nur äusserst geringe Arginin-Quantitäten oder es liess sich diese Base gar nicht mehr aus denselben isoliren.

Vergleicht man die jüngeren mit den älteren Keimpflanzen in Bezug auf ihren Stoffgehalt, so zeigt sich auf das Deutlichste, dass manche Produkte des Eiweissumsatzes, insbesondere Leucin, Tyrosin und Arginin, mit der fortschreiten-

¹⁾ Die Ausbeute an Leucin, die sich freilich nur approximativ bestimmen liess, zeigte bei den verschiedenen 6—7 tägigen Keimpflanzen keine grossen Unterschiede; Tyrosin fand sich stets in weit geringerer Menge vor als Leucin. Unter den Hexonbasen prävalirte der Menge nach stets das Arginin. Keine der Hexonbasen wurde in so grosser Quantität erhalten, wie das Leucin, abgesehen davon, dass bei *Lupinus luteus* das Arginin schon in den 6—7 tägigen Keimpflanzen in recht beträchtlicher Menge auftrat.

andererseits das Asparagin sich stark vermehrt; jene Stoffe werden also im Stoffwechsel der Keimpflanzen verbraucht und umgewandelt. Ein Verbrauch solcher Stoffe, z. B. des Leucins und des Arginins, ist selbstverständlich auch dann anzunehmen, wenn die Quantitäten dieser Stoffe in einer Keimpflanze nach mehrwöchentlicher Dauer der Vegetation nicht grösser sind, als nach einwöchentlicher; denn mit der Fortdauer des Eiweisszerfalls würden doch, falls nicht ein Verbrauch stattgefunden hätte, die Quantitäten jener Stoffe sich in der Pflanze vermehrt haben.¹⁾

Zur Erklärung der starken Anhäufung des Asparagins in manchen Keimpflanzen habe ich schon vor langer Zeit die Vermuthung ausgesprochen, dass im Stoffwechsel der Keimpflanzen andere Produkte des Eiweissumsatzes in Asparagin umgewandelt werden. Die an Keimpflanzen von *Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius* von M. Merlis, E. Winterstein, N. Rongger und mir ausgeführten quantitativen Bestimmungen, deren Ergebnisse ich in meiner ersten Abhandlung über den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze mittheilte, haben bewiesen, dass in der That in diesen Keimpflanzen Asparagin auf Kosten anderer Produkte des Eiweissumsatzes gebildet worden war.²⁾ Was für Produkte es sind, die vorzugsweise für diesen Process verwendet werden, darüber konnte ich dort etwas Bestimmtes nicht aussprechen. Hatte ich auch schon das Verschwinden von Tyrosin und Leucin aus *Lupinus*-Keimpflanzen constatirt, so waren dies doch nur vereinzelte Beobachtungen. Aus den Versuchen, deren Ergebnisse in dieser Abhandlung mitgetheilt worden sind, geht aber

1) Wer die obige Schlussfolgerung nicht ziehen will, müsste annehmen, dass im Beginn des Keimungsvorgangs die Eiweissstoffe nach ganz anderer chemischer Gleichung zerfallen, als später; ich glaube aber nicht, dass irgend Jemand geneigt sein wird, eine solche Hypothese aufzustellen.

2) Auch quantitative Bestimmungen, die von Prianischnikow (Landw. Versuchsstat. Bd. 52, S. 347) ausgeführt wurden, sprechen dafür, dass Asparagin als secundäres Produkt des Eiweissumsatzes auftreten kann.

Hexonbasen in den Papilionaceen-Keimpflanzen eine regelmässige Erscheinung ist; es ist daher sehr wahrscheinlich, dass vorzugsweise diese Stoffe für jenen Asparagin-Bildungsprocess verwendet werden. Doch ist es sehr wohl möglich, dass auch noch andere Produkte des Eiweissumsatzes das gleiche Schicksal haben.

Wie gross die in einer Keimpflanze entstehenden Quantitäten von Leucin, Tyrosin und Arginin sind, wieviel von diesen Stoffen also für die Asparaginbildung zur Verfügung steht, das lässt sich selbstverständlich nicht genau angeben. Am nächsten liegt wohl die Annahme, dass ein Eiweissstoff beim Zerfall in einer Keimpflanze jene Produkte in der gleichen Quantität liefern kann, wie bei der Spaltung ausserhalb des Organismus; doch können vielleicht in bestimmten Fällen manche Umstände verändernd auf das Mengenverhältniss einwirken, in welchem die Eiweisszersetzungsprodukte neben einander entstehen.¹⁾

¹⁾ In der 2. Auflage seiner « Pflanzenphysiologie » auf S. 464 kritisiert W. Pfeffer die von mir früher ausgesprochene Annahme, dass beim Zerfall eines Eiweissstoffes in einer Pflanze die einzelnen Amidosäuren in der gleichen Quantität entstehen, wie bei der Zerspaltung dieses Eiweissstoffes ausserhalb des Organismus. Zu dieser Kritik habe ich erstens zu bemerken, dass ich jene Annahme zu einer Zeit ausgesprochen habe, in welcher die Vorstellung, dass die Amidosäuren als constituirende Atomgruppen im Eiweissmolekül enthalten seien — eine Vorstellung, welche zu jener Annahme führen muss — sehr verbreitet bei denjenigen Chemikern war, die sich mit dem Studium der Eiweissstoffe hauptsächlich beschäftigt haben. Nachdem aber Einwände gegen jene Vorstellung erhoben worden waren, habe ich schon 1892 in den Landwirthschaftlichen Jahrbüchern, Bd. XXI, S. 120—121, also lange vor Erscheinen der 2. Auflage des Pfeffer'schen Buchs, erklärt, dass ich der veränderten Sachlage Rechnung tragen und Denjenigen nicht entgegenreten wolle, welche jene Annahme nicht theilen. Zweitens aber möchte ich bezweifeln, dass die bestimmte Art und Weise, in welcher Pfeffer die obige Annahme verwirft, in unserem heutigen Wissen eine genügende Stütze hat. Ob bei der Spaltung eines bestimmten Eiweissstoffes unter verschiedenen Umständen Leucin oder Tyrosin oder Arginin oder irgend eine andere Stickstoffverbindung in wechselnder oder stets in der gleichen Quantität entsteht, das ist eine Frage, die zur Zeit Niemand mit Sicher-

Während in den übrigen von uns untersuchten Papilionaceen-Keimpflanzen allem Anschein nach das Arginin rasch verbraucht wird, häuft es sich dagegen in den Cotyledonen der etiolirten Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in starkem Maasse an. Diese Anhäufung deutet darauf hin, dass die genannte Base hier dem Verbrauch entzogen ist; worin der Grund dafür liegt, entzieht sich freilich bis jetzt unserer Kenntniss. Bei *Lupinus luteus* sowohl wie bei einigen anderen Papilionaceen häufen sich in den etiolirten Keimpflanzen ferner Phenylalanin und Amidovaleriansäure an, jedoch nicht in starkem Maasse. Sie finden sich vorzugsweise in den Axenorganen der älteren Keimpflanzen. In 6—7 tägigen Keimpflanzen traten sie nur in sehr geringer Menge auf und waren in einigen solchen Objecten gar nicht nachzuweisen; es ist daher wahrscheinlich, dass diese beiden Amidosäuren beim Zerfall der Eiweissmoleküle nur in kleiner Quantität entstehen.¹⁾

Ein ungleicher Verbrauch der einzelnen Eiweisszersetzungsprodukte in den verschiedenen Keimpflanzenarten kann zur Folge haben, dass in Bezug auf den Stoffgehalt bei den älteren Keimpflanzen grosse Verschiedenheiten hervortreten.²⁾

heit beantworten kann. Die Entscheidung dieser Frage kann nur durch das Experiment gegeben werden. Man hat ja gerade in neuester Zeit Quantitätsbestimmungen der bei der Eiweisspaltung entstehenden Produkte in Angriff genommen; doch können die dabei erhaltenen Resultate selbstverständlich nur entscheidend sein, wenn man sicher ist, dass secundäre Zersetzungen der primären Spaltungsprodukte vermieden wurden.

1) In seinem Werke «die chemische Energie der lebenden Zellen» spricht O. Loew die Vermuthung aus, dass die in den Keimpflanzen auftretende Amidovaleriansäure durch Oxydation des Leucins oder durch Zersetzung des Arginins entstanden sei. Diese Frage lässt sich vielleicht discutiren, sobald man über die Constitution jener Amidovaleriansäure etwas weiss (Versuche darüber sind von uns in Aussicht genommen).

2) Auch in der gleichen Keimpflanzenart kann wohl der Verbrauch einzelner Eiweisszersetzungsprodukte unter verschiedenen Umständen ein ungleicher sein. Auf diese Ursache sowie auf den Umstand, dass in manchen Keimpflanzen, bald Asparagin bald Glutamin in grösserer Menge

Anhäufung des Asparagins in den Keimpflanzen zu erklären gesucht habe, bildet auch die ungleiche Vertheilung der Eiweisszersetzungsprodukte innerhalb der Keimpflanzen. Ich habe dies schon in der ersten Abhandlung dargelegt, komme aber hier darauf zurück, weil ich inzwischen durch Versuche an *Lupinus luteus* über jene Vertheilung noch mehr Aufschluss gewonnen habe. Nach diesen Versuchen enthalten die Cotyledonen 6—7tägiger Keimpflanzen der genannten *Lupinus*-Art Asparagin in beträchtlicher Menge, ferner Leucin, Tyrosin, Arginin, Histidin und Lysin; auf das Vorhandensein einer sehr kleinen Quantität von Phenylalanin deutet das Entstehen einer geringen Benzoessäuremenge bei der Oxydation der Amidosäuren hin; Amidovaleriansäure konnte nicht nachgewiesen werden. In den Axenorganen der gleichen Keimpflanzen fand sich Asparagin, und zwar in viel grösserer Quantität als in den Cotyledonen, ferner Phenylalanin sowie

sich bildet, ist wohl das wechselnde Auftreten der Eiweissumsatzprodukte in den Keimpflanzen (vgl. meine Abhandlungen in dieser Zeitschrift, Bd. XX, S. 306 und Bd. XXII, S. 411) zurückzuführen. Doch ist darauf aufmerksam zu machen, dass manche Erscheinungen, die ich früher als Beispiele für dieses «wechselnde Auftreten» anführte, inzwischen in anderer Weise ihre Erklärung gefunden haben, so z. B. die Unterschiede, die zwischen Belzung's und meinen Beobachtungen über den Stoffgehalt von *Lupinus albus* und *Lupinus luteus* sich zeigten. Belzung fand bei *Lupinus albus* in 8tägigen Keimpflanzen viel Leucin, während ich aus den Axenorganen in 10- und 14tägigen etiolirten Pflänzchen nur Phenylalanin und Amidovaleriansäure erhalten konnte. Inzwischen haben aber Wassilieff und ich aus einwöchentlichen Keimpflanzen von *Lupinus albus* leicht Leucin darstellen können und zwar aus den Cotyledonen (die Axenorgane enthalten auch bei diesen Pflänzchen mehr von jenen anderen Amidosäuren als von Leucin). Ebenso stimmt Belzung's Angabe, dass Keimpflanzen von *Lupinus luteus* Tyrosin lieferten, mit dem Resultat überein, das ich bei Untersuchung 8tägiger Keimpflanzen dieser *Lupinus*-Art erhielt. Ueberhaupt ist nach den jetzt vorliegenden Erfahrungen der Stoffgehalt der unter gleichen Umständen gezogenen verschiedenen Culturen der gleichen Keimpflanzenart constanter, als ich damals annehmen konnte; Unterschiede aber können sich zeigen, sobald diese Culturen unter verschiedenen Bedingungen, z. B. mit oder ohne Lichtzutritt, gezogen sind.

nachzuweisen und können höchstens in sehr kleiner Quantität vorhanden gewesen sein; Arginin fehlte nicht völlig, war aber zweifellos in weit geringerer Menge vorhanden, als in den Cotyledonen. Die grosse Verschiedenheit zwischen dem Stoffgehalt der Cotyledonen und der Axenorgane, die sich, freilich nicht in dem gleichen Grade, auch bei den Keimpflanzen anderer Papilionaceen wieder findet, lässt sich auf Grund der oben erwähnten Annahme in folgender Weise erklären: Die beim Eiweisszerfall in den Cotyledonen entstandenen Produkte (Asparagin, Leucin, Tyrosin u. s. w.) fliessen den im Wachsthum begriffenen Theilen der Keimpflanzen zu¹⁾; zugleich wird aber ein grosser Theil dieser Produkte in Asparagin umgewandelt; daher finden wir dieses Amid in den Axenorganen in weit grösserer Quantität, ja sogar zuweilen in stärker concentrirter Lösung als in den Cotyledonen,²⁾ während dagegen andere Eiweisszersetzungsprodukte, wie z. B. Leucin und Tyrosin, nur in den Cotyledonen, nicht aber in den Axenorganen sich nachweisen lassen.

Der Eiweisszerfall ist bei *Lupinus luteus* in den 6—7tägigen Keimpflanzen ein sehr lebhafter; in den 14—15tägigen Pflänzchen findet er nur noch mit geringerer Intensität statt. Bei den letzteren finden wir in den Cotyledonen neben sehr beträchtlichen Quantitäten von Asparagin und von dem hier anscheinend dem Verbrauch ganz entzogenen Arginin Amidosäuren (wahrscheinlich ein Gemenge von Phenylalanin, Leucin und Amidovaleriansäure) nur in äusserst geringer Menge, in den Axenorganen dagegen eine ausserordentlich grosse Menge von Asparagin sowie ziemlich beträchtliche Quantitäten von Phenylalanin und Amidovaleriansäure. Die Anhäufung des Asparagins erklärt sich in der eben angegebenen Weise; für die gleichzeitig, wenn auch in ungleich geringerem Maasse stattfindende

¹⁾ Doch scheint das Arginin grösstentheils in den Cotyledonen zurückzubleiben.

²⁾ Wie sich aus früher von mir ausgeführten Bestimmungen ergibt; man vergl. Landwirthsch. Jahrbücher, Bd. 7, S. 424 u. 435.

Annahme von Phenylalanin und Amidovaleriansäure hat man eine Erklärung, wenn man annimmt, dass diese beiden beim Zerfall der Eiweissmoleküle wahrscheinlich nur in geringer Quantität entstehenden Amidosäuren in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* der Umwandlung entgehen. Diese Annahme kann auch für andere Papilionaceen-Keimpflanzen gelten; denn jene beiden Amidosäuren finden sich auch in den Axenorganen etiolirter Keimpflanzen von *Lupinus albus*, sowie in etiolirten Wicken-Pflänzchen vor.

Eine befriedigende Erklärung für die ungleiche Vertheilung der Eiweisszersetzungsprodukte auf Cotyledonen und Axenorgane zu finden, ohne die in Bezug auf die Bildungsweise des Asparagins von mir ausgesprochene Annahme zu Hülfe zu ziehen, dürfte nicht leicht sein. Da wir anzunehmen haben, dass auch in den im Dunkeln sich entwickelnden Pflanzen bei genügendem Vorhandensein stickstofffreier Stoffe Amide zu Eiweiss regenerirt werden können, so könnte man auf den Gedanken kommen, das Fehlen von Leucin, Tyrosin u. s. w. in den Axenorganen auf einen Verbrauch dieser Stoffe für die synthetische Eiweissbildung zurückzuführen. Letzteres würde aber, da die wachsenden Theile etiolirter Keimpflanzen sehr eiweissarm sind und da also nur ein kleiner Theil der aus den Cotyledonen zufließenden Eiweisszersetzungsprodukte in ihnen wieder in Eiweiss umgewandelt wird,¹⁾ nur möglich sein unter der Voraussetzung, dass erstens beim Zerfall der Eiweissmoleküle das Asparagin in weit grösserer Quantität entsteht, als alle übrigen stickstoffhaltigen Produkte zusammengekommen, und dass zweitens in den Keimpflanzen nicht auf Kosten von Asparagin, sondern nur auf Kosten anderer Eiweisszersetzungsprodukte (Amidosäuren u. s. w.) synthetische Bildung von Eiweissstoffen stattfindet. Dass die letztere Annahme eine ganz unwahrscheinliche

1) Allerdings kann die in den Axenorganen neu gebildete Eiweissmenge grösser sein, als es den Anschein hat; denn auch in den Axenorganen findet ja höchstwahrscheinlich Eiweisszerfall statt. Doch würde es sehr gewagt sein, anzunehmen, dass dieser Eiweisszerfall in den Axenorganen die Spaltungsprodukte in ganz anderem Mengenverhältniss liefert, als in den Cotyledonen.

ist, werde ich weiter unten noch zeigen, was die erste Annahme betrifft, so ist sie zwar von einigen Autoren ausgesprochen worden; man hat aber für dieselbe keine andere experimentelle Stütze beizubringen vermocht, als eben die Thatsache, dass in den Keimpflanzen das Asparagin in so ausserordentlich grosser Quantität auftritt. Nachdem aber von mir nachgewiesen worden ist, dass die Anhäufung des Asparagins von einem Verbrauch von Leucin, Tyrosin, Arginin u. s. w. begleitet ist und dass jenes Amid auf Kosten anderer Produkte des Eiweissumsatzes in den Pflänzchen sich bildet, kann jene Thatsache nicht mehr als eine Stütze für die obige Annahme betrachtet werden. Auch steht diese Annahme nicht im Einklang mit den Kenntnissen, die wir über das chemische Verhalten der Eiweissstoffe ausserhalb des Organismus besitzen. Demnach muss diese Annahme als eine nicht nur ganz unbewiesene, sondern auch sehr unwahrscheinliche auf das Entschiedenste zurückgewiesen werden.

Ich muss nun noch einen Blick auf die Zusammensetzung der von uns untersuchten normalen, d. h. am Licht erwachsenen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, *Lupinus albus* und *Vicia sativa* werfen, welche ein Alter von mindestens 14 Tagen erreicht hatten und theils in Sand, theils in fruchtbarer Erde im Freien gezogen worden waren. Diese Pflänzchen lieferten bei der Untersuchung meistens nur eine Amidosäure, nämlich Leucin, und zwar nur in sehr geringer Quantität. Arginin war in den Cotyledonen der Pflänzchen von *Lupinus luteus* nachzuweisen, fand sich aber hier in weit geringerer Quantität vor als in den Cotyledonen der etiolirten Pflanzen gleicher Art. Alle diese normalen Pflänzchen enthielten Asparagin in sehr grosser Quantität. Zum Beweise führe ich im Folgenden nur die Zahlen an, welche von N. Wassilieff nach Sachsse's Methode für den Asparagingehalt der Trockensubstanz der verschiedenen Theile 14tägiger normaler Pflanzen von *Lupinus albus* erhalten wurden:¹⁾

1) Zur Kontrolle der nach Sachsse's Methode erhaltenen Zahlen wurden aber auch die Asparaginnengen bestimmt, die sich aus den Extracten durch Krystallisation erhalten liessen.

Cotyledonen	17,55%	>
Stengel	21,12%	>
Wurzel	10,23%	>

So viel nach den bisher vorliegenden Versuchen sich urtheilen lässt, finden sich in den normalen grünen Pflanzen auf die gleiche Asparaginmenge viel weniger andere krystallisirbare Produkte des Eiweissumsatzes (Amidosäuren und Hexonbasen) vor, als in den etiolirten Pflanzen gleichen Alters. Diese Erscheinung erklärt sich, wenn man die von vornherein nicht unwahrscheinliche Annahme macht, dass gerade in den normalen Pflanzen die Verhältnisse für die Umwandlung anderer Produkte des Eiweissumsatzes in Asparagin besonders günstig liegen. Mit Hülfe dieser Annahme erklärt sich dann auch leicht die schon vor langer Zeit von mir gemachte Beobachtung, dass in Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, welche nach 10-tägigem Verweilen im Dunkeln ans Licht gebracht worden waren, in den ersten Wochen die absolute Asparaginmenge noch eine Vermehrung erfahren hatte, obwohl gleichzeitig auch eine Zunahme der Eiweissmenge eingetreten war. Aus dieser Beobachtung glaubte ich damals den Schluss ziehen zu sollen, dass nicht auf Kosten von Asparagin, sondern nur auf Kosten anderer nicht eiweissartiger Stickstoffverbindungen die Eiweissbildung erfolgt sei (eine Schlussfolgerung, die ich jedoch bald wieder verlassen habe). Aehnlich hat sich später D. Prianischnikow¹⁾ ausgesprochen, nachdem er die Beobachtung gemacht hatte, dass in jungen, an Eiweisszersetzungsprodukten reichen Papilionaceen-Pflänzchen, in denen unter dem Einfluss der im Assimilationsprocess erzeugten Kohlenhydrate eine Vermehrung der Eiweissstoffe stattgefunden

¹⁾ Berichte der D. Botanischen Gesellschaft 1899, Bd. XVII, S. 151, ausführlicher in den „Landw. Versuchsstationen“, Bd. 52, S. 347. Der Versuch, den Prianischnikow speciell mit *Lupinus luteus* anstellte, zeigte in den Resultaten einige Verschiedenheiten von den meinigen, was sich aber leicht aus der Ungleichheit der Versuchsbedingungen erklärt; ich verweise auf Bemerkungen, die ich darüber in den „Landw. Versuchsstationen“ machen werde.

hatte, eine weit geringere Abnahme des Asparagins als der übrigen nicht proteinartigen Stickstoffverbindungen zu beobachten war (insbesondere in Pflänzchen von *Pisum sativum* hatte trotz starker Vermehrung der Eiweissstoffe das Asparagin nur ganz unbedeutend an Menge abgenommen). Prjanschnikow nimmt an, dass in solchen Fällen der Stickstoff für die Eiweiss-synthese in der Hauptsache nicht vom Asparagin, sondern von andern Eiweisszersetzungsprodukten (Amidosäuren) geliefert worden sei.

Nach unserem heutigen Wissen kann diese Schlussfolgerung nicht mehr als eine berechtigte angesehen werden; denn erstens erklärt sich die Nichtverminderung der Asparaginmenge in den ans Licht gebrachten Keimpflanzen sehr leicht aus der Bildung von Asparagin auf Kosten anderer Eiweisszersetzungsprodukte, und zweitens spricht sehr Vieles dafür, dass gerade das Asparagin ein für die Eiweiss-synthese in der Pflanze leicht verwendbares Material ist. Die Beobachtungen, welche eine Stütze für letztere Annahme bilden, will ich im Folgenden zusammenstellen.

Bekanntlich verfolgte W. Pfeffer¹⁾ die Wanderung der Glucose und des Asparagins in Lupinus-Keimpflanzen mit Hülfe des Mikroskops und kam dabei zu dem Resultat, dass Alles, was hinsichtlich der Zeit des Auftretens, der Art der Wanderung und des Verschwindens in den wachsenden Organen für Glucose zu beobachten ist, in den wesentlichen Zügen auch für das Asparagin gilt; er zieht daraus den Schluss, dass, ebenso wie die Glucose Baumaterial für die Zellhaut, so das Asparagin Baumaterial für die eiweissartigen Stoffe des Protoplasmas ist. Dieser Schlussfolgerung haben andere Botaniker, z. B. Borodin²⁾ sich angeschlossen. Auf den Verbrauch des Asparagins in den Blättern, die man als den Sitz einer lebhaften Eiweissbildung betrachtet, deuten auch die Resultate quantitativer

¹⁾ Pringheim's Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik, Bd. VIII, S. 429, sowie landw. Jahrbücher 1876, S. 87.

²⁾ Botanische Zeitung 1878, S. 802.

Bestimmungen nach 30 Land. Jahrb. 1888, S. 688. Bei Untersuchung junger Pflanzen von *Medicago sativa* in den Stengeln weit mehr Asparagin, als in den Blättern; noch ärmer an diesem Amid waren Blätter, von denen vor der Untersuchung die Blattstiele abgetrennt worden waren. Bei Untersuchung von Pflänzchen von *Lupinus luteus*, die zuerst im Dunkeln, dann ca. 4 Wochen lang im Freien am Licht vegetirt hatten, erhielt ich aus den Laubblättchen nebst Stielen und Stammspitze nur 6% Asparagin, aus den übrigen Teilen (Hypocotyles Glied, Wurzel und Cotyledonen) dagegen 18,4% Asparagin (die Zahlen sind Procente der Pflanzentrockensubstanz; das Asparagin wurde in Krystallform gewonnen.)¹⁾ Bei Untersuchung 14-tägiger grüner Pflänzchen von *Lupinus albus*, welche im Freien in fruchtbarer Erde gewachsen waren und 5—7 Laubblättchen entwickelt hatten, fand N. Wassilieff²⁾ in den Blättern mit Blattstielen 6,7%, in den Stengeln dagegen 21,1% Asparagin;³⁾ wahrscheinlich wäre die Differenz noch grösser gewesen, wenn man die Blätter zuvor von den Stielen befreit hätte. Dass der Mindergehalt an Asparagin in den Blättern auf einen Verbrauch dieses Amids zur Eiweissbildung zurückzuführen ist, darf auch aus der nachfolgenden Tabelle geschlossen werden, in welcher die Vertheilung des Gesamtstickstoffs auf Proteinstoffe, Asparagin etc. in den Blättern und in den Stengeln nach Wassilieff's Analysen angegeben ist:

1) Landw. Jahrbücher 1888, S. 688—689. Ich reproducire hier die bezüglichen Angaben:

170 g	frische Blätter mit Blattstielen	lieferten	0,4 g	Asparagin
200 „	„	ohne Blattstiele	0,1 „	„
200 „	„	Stengel	1,17 „	„
390 „	„	(anderes Material)	1,50 „	„

Das Asparagin wurde durch Ausfällung mit Mercurinitrat zur Abscheidung gebracht und in Krystallform gewonnen.

2) Mitgetheilt in den Landwirthsch. Jahrbüchern, 1880, Bd. 9, S. 729.

3) Nach einer noch nicht publicirten Untersuchung, die in meinem Laboratorium ausgeführt wurde.

4) Bestimmt nach Sachsse's Methode; die Zahlen bedeuten Procente der Trockensubstanz.

	auf Protein- stoffe	auf den Phosphor- wolframsäure- niederschlag	auf Asparagin	auf andere Verbindungen
In den Blättern	62,56	8,06	21,46	7,92
In den Stengeln	23,04	6,20	66,17	4,59

Diese Zahlen sprechen auf das Entschiedenste dafür, dass in den Blättern das Asparagin einem lebhaften Verbrauch zur Eiweissbildung unterlag,¹⁾ während sie dagegen keine Stütze für die Annahme liefern, dass andere Amidverbindungen in der gleichen Weise verwendet wurden. Aus den quantitativen Bestimmungen Kosutany's²⁾ scheint hervorzugehen, dass in den Blättern während der Nacht das Asparagin zur Eiweissbildung verwendet wird (als Versuchspflanze diente in diesem Falle die amerikanische Weinrebe.) Hansteen³⁾ schliesst aus seinen Versuchen, dass in den mit einem Gemisch von Asparagin und Traubenzucker ernährten Versuchspflanzen lebhaft Eiweissbildung erfolgte. Shibata⁴⁾ folgert aus seinen Beobachtungen, dass in Bambus-Schösslingen, in denen zeitweilig Asparagin in beträchtlicher Menge auftritt, die Bildung von Eiweissstoffen auf Kosten dieses Amids leicht und rasch erfolgen kann.

Für die Annahme, dass Leucin und Tyrosin ein besseres oder auch nur eben so gutes Material für die Eiweiss-synthese sind, als das Asparagin, liegen Beweise bis jetzt nicht vor.

1) Sollte es noch einer weiteren Stütze für diese Schlussfolgerung bedürfen, so kann ich mittheilen, dass ich die Blättchen etiolirter Keimpflanzen von *Lupinus albus* (nur das erste Blättchenpaar entwickelt sich an solchen Pflänzchen) sehr reich an Asparagin fand; die luft-trockenen Blättchen lieferten 17,7% Asparagin (abgeschieden durch Krystallisation aus dem wässerigen Extract).

2) Landw. Versuchsstationen, Bd. XLVIII, S. 13.

3) Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft 1896, Bd. XIV, S. 312.

4) Botanisches Centralblatt 1899, Nr. 44.

dem seinen Versuchspflanzen zugeführten Nährstoffgemisch das Asparagin durch Leucin oder Tyrosin ersetzte. Negative Resultate erhielt auch Lutz,¹⁾ als er Pflanzen mit Leucin und Tyrosin zu ernähren versuchte. Die von Lutz aus seinen Versuchen abgeleitete Schlussfolgerung, dass diese beiden Amidosäuren unassimilirbar für phanerogame Pflanzen seien, muss aber, als nicht genügend begründet, zurückgewiesen werden.²⁾ Nach den Beobachtungen Shibata's (loc. cit.) wird in den Bambusschösslingen das Tyrosin schwieriger und später zur Eiweissbildung verbraucht, als das Asparagin. Auch für den Hefepilz³⁾ scheint das Leucin ein weit ungünstigeres Nährmaterial zu sein, als das Asparagin.⁴⁾ Selbstverständlich machen aber diese Thatsachen nicht die Annahme unmöglich, dass unter geeigneten Bedingungen auch solche Amidosäuren für die Eiweiss-synthese von Werth sind.⁵⁾

Die im Vorigen aufgeführten Thatsachen machen es sehr wahrscheinlich, dass die Umwandlung des Leucins, Tyrosins oder anderer Eiweisszersetzungsprodukte in Asparagin in den Keimpflanzen den Zweck hat, Stickstoffverbindungen, die hier für die Eiweiss-synthese aus irgend einem Grunde nicht leicht verwendbar sind, in ein für diese Synthese geeigneteres Material umzuformen. Der Grund, aus welchem manche Eiweisszersetzungsprodukte für den genannten Process nicht so gut verwendbar sind wie Asparagin, kann entweder in der chemischen

1) Annales des sciences naturelles, 8^e série Botanique, T. VII, Nr. 1.

2) Ich verweise auf die Kritik der bezüglichlichen Angaben von Lutz, die ich in den Berichten der deutschen botanischen Gesellschaft 1900, Bd. XVIII, S. 40, Anmerkung 6 gegeben habe.

3) A. Mayer, Lehrbuch der Gährungschemie, 1. Auflage, S. 114, sowie Lintner, Handbuch der landwirthschaftlichen Gewerbe, S. 236.

4) Die Beweiskraft der älteren Versuche von Knop und Wolf über die Möglichkeit der Ernährung von Culturpflanzen mit Leucin und Tyrosin wird neuerdings angezweifelt, weil es denkbar ist, dass jene beiden Amidosäuren in den nicht sterilisirten Nährstofflösungen vor ihrer Aufnahme in die Pflanzen unter Ammoniakbildung zersetzt worden sind.

5) Man vergleiche auch A. Emmerling's Studien über die Eiweissbildung in der Pflanze (Landw. Versuchsstationen, Bd. XXXIV, S. 1).

derselben, z. B. auch in ihrem osmotischen Verhalten liegen. Für den Transport im Säftestrom kann die Pflanze, so müssen wir annehmen, nicht jede in ihrem Stoffwechsel entstandene lösliche Stickstoffverbindung gebrauchen; es kann uns daher nicht überraschen, wenn Umformungen solcher Verbindungen stattfinden. Das Gleiche gilt ja auch für die stickstofffreien Pflanzenbestandtheile. So sehen wir, dass gewisse lösliche Kohlenhydrate (Lupeose etc.) in der Pflanze in andere Formen, z. B. in Rohrzucker umgewandelt werden.¹⁾ Die Bildung dieser Zuckerart weist noch in anderer Beziehung eine Analogie mit der Asparaginbildung auf. Wir finden den Rohrzucker, den wir doch gewiss als einen in der Pflanze leicht verwendbaren Reservestoff anzusehen haben, in kleiner Quantität in vielen Pflanzensamen, und zwar scheint er vorzugsweise im Blatt- und Wurzelkeim enthalten zu sein (bestimmt nachgewiesen ist dies beim Weizenkorn). Während der Keimung der Samen sehen wir den Rohrzucker an Quantität sich nicht verringern, sondern sogar zunehmen, während dagegen andere lösliche Kohlenhydrate gleichzeitig an Menge abnehmen. Auf den ersten Blick könnte man denken, dass die Pflanzen nur die letzteren Kohlenhydrate, nicht aber den Rohrzucker, für Wachstumszwecke verwendet haben; diese Schlussfolgerung würde aber gewiss eine irrige sein, gerade so wie es nach meiner Ansicht auch unrichtig ist, aus der Nichtabnahme des Asparagins in jungen Papilionaceenpflänzchen zu schliessen, dass hier das Asparagin nicht zum Verbrauch gelange.

Wie ich im Vorigen gezeigt zu haben glaube, ist die Annahme, dass in den Keimpflanzen auf Kosten anderer Produkte des Eiweissumsatzes Asparagin sich bildet, nicht nur eine gut begründete, sondern sie ist auch nothwendig für das Verständniss der an den Keimpflanzen gemachten Beobachtungen. Ich möchte hier nur noch darauf aufmerksam machen, dass auch die an

¹⁾ Man vergleiche unsere Untersuchungen über die Verbreitung des Rohrzuckers in den Pflanzen und über seine physiologische Rolle. Diese Zeitschrift, Bd. XX. S. 511 und Bd. XXVII, S. 267.

normalen Keimpflanzen beobachteten Erscheinungen eine starke Stütze für diese Annahme bilden. Da wir das Asparagin als ein für die Eiweiss-synthese in der Pflanze sehr geeignetes Material anzusehen haben, so würde ohne die obige Annahme es geradezu räthselhaft sein, dass normale, lebhaft assimilirende Pflänzchen sehr reich an Asparagin sind, während in ihnen Amidosäuren und Hexonbasen theils nur in sehr geringer Menge vorhanden sind, theils ganz fehlen.

Dass die Bildung von Asparagin auf Kosten anderer Eiweisszersetzungsprodukte ein für die Pflanze nützlicher Vorgang ist, kann man im Hinblick auf die im Vorigen mitgetheilten Thatsachen wohl annehmen. Wie dieser Process in der Pflanze verläuft, darüber lassen sich zur Zeit nur Vermuthungen äussern. Da wir aber nicht daran zweifeln können, dass die Pflanze befähigt ist, Umformungen sowie Synthesen complicirt zusammengesetzter organischer Verbindungen mit Leichtigkeit auszuführen, so kann die Annahme einer Umwandlung von Leucin, Tyrosin und anderen Stickstoffverbindungen in Asparagin im pflanzlichen Stoffwechsel kaum auf Bedenken stossen.

Dass höchstwahrscheinlich das in manchen Keimpflanzen sich anhäufende Glutamin die gleichen Functionen im pflanzlichen Stoffwechsel zu erfüllen vermag, wie das Asparagin, ist in der ersten Abhandlung von mir ausgesprochen worden; im Vorigen habe ich von diesem Amid nur deshalb nicht gesprochen, weil dasselbe in den Keimpflanzen der Papilionaceen fehlt oder doch nur in sehr kleiner Quantität vorhanden ist. In den glutaminreichen Keimpflanzen von Cucurbita pepo und Ricinus communis habe ich neben Glutamin Amidosäuren (Leucin, Tyrosin) und Arginin nachgewiesen; dass die Anhäufung des Glutamins von einem Verbrauch anderer Eiweisszersetzungsprodukte begleitet ist, darf wohl aus den an Ricinuskeimpflanzen ausgeführten quantitativen Bestimmungen geschlossen werden.

Für die Entscheidung der Fragen, mit denen ich mich in dieser Abhandlung beschäftigt habe, sind die Keimpflanzen der Papilionaceen besonders günstige Objecte. Denn in ihnen findet während des ersten Keimungsstadiums ein sehr rascher

während dieses Keimungsstadiums einen beträchtlichen Theil der primären Eiweisszersetzungsprodukte noch unverändert vorzufinden. Weit ungünstigere Objecte sind die Keimpflanzen der Getreidearten. Nicht nur sind dieselben weit ärmer an Stickstoffverbindungen, sondern es verläuft auch in ihnen der Eiweisszerfall weit langsamer. Wenn nun auch hier die primären Eiweisszersetzungsprodukte in Asparagin sich umwandeln, so wird der Gehalt der Keimpflanzen an Produkten der ersteren Art bald ein so niedriger werden, dass der Nachweis dieser Produkte auf sehr grosse Schwierigkeiten stösst.

Ich komme zum Schlusse. Die in meiner ersten Abhandlung über den Eiweissumsatz in der lebenden Pflanze ausgesprochenen Ansichten haben durch die Versuche, deren Resultate ich im Vorigen mitgetheilt habe, neue Stützen erhalten. Die von mir aufgestellte Hypothese, dass beim Zerfall der Eiweissstoffe in den Keimpflanzen überall im Wesentlichen die gleichen Produkte entstehen, habe ich für die von mir untersuchten Papilionaceenkeimpflanzen beweisen können; ich vermochte zu zeigen, dass 6—7tägige Keimpflanzen von *Vicia sativa*, *Pisum sativum*, *Lupinus luteus* und *Lupinus albus* sämmtlich Asparagin, Leucin, Tyrosin, Arginin, Histidin und Lysin enthalten. Ferner habe ich nachweisen können, dass die Anhäufung des Asparagins in den Keimpflanzen von einem Verbrauch anderer Eiweisszersetzungsprodukte, insbesondere des Leucins, Tyrosins und Arginins, begleitet ist. Diese Stoffe gelangen aber nicht überall gleichmässig zum Verbrauch, wie z. B. daraus hervorgeht, dass bei *Lupinus luteus* auch Arginin sich ansammelt, und dass die älteren etiolirten Keimpflanzen zuweilen Leucin noch in ziemlich beträchtlicher Quantität, zuweilen aber nur in sehr kleiner Menge enthalten. Aus diesen Thatsachen ist aber zu schliessen, dass die wechselnde Zusammensetzung des in den älteren etiolirten Keimpflanzen sich findenden Gemenges von Eiweisszersetzungsprodukten, das fast völlige Fehlen einzelner Amidosäuren und Hexonbasen in diesem Gemenge, sowie das Ueberwiegen von Asparagin oder Glutamin durch die Umwand-

Eiweisszersetzungsprodukte im pflanzlichen Stoffwechsel unter-
 rt.¹⁾ Aus diesen Thatsachen ergibt sich zugleich die völlige
 haltbarkeit der Hypothese, dass die Eiweissstoffe in den
 Pflanzen in Asparagin und ein Kohlenhydrat zerfallen.
 Bekanntlich glaubt man, dass beim Eiweisszerfall im
 per Amidosäuren der fetten Reihe, aromatische Amido-
 und Hexonbasen als Vorstufen des Harnstoffs sich
 e aus ihnen später Harnstoff entsteht, darüber kann
 f Grund der Arbeiten E. Drechsel's²⁾ und Anderer
 ung machen. Jene Stickstoffverbindungen, deren
 im Zerfall der Eiweissmoleküle im Thierkörper
 cheinlich gehalten wird, sind in den Keim-
 erheit nachgewiesen worden; sie finden sich,
 habe, in 6—7tägigen Papilionaceen-Keim-
 ander vor. Daraus ist aber zu ersehen,
 ier der Abbau der Eiweissstoffe erfolgt.
 lichen Process für eine hydrolytische
 en, so lange, als man die zu den
 nden Zersetzungen der Eiweissstoffe
 Trypsin als hydrolytische Spaltungen

hang.

t, dass in Papilionaceen-Keim-
 r nur eine Woche betragen
 onbasen neben Asparagin
 age nach dem Agens, das
 sstoffe zum Zerfall bringt,

zur Zeit für unbewiesen,
 e einen Theil der Unter-
 les Gehalts an Amido-
 zenarten finden (ich
 in dieser Zeitschrift,

weissstoffe, Archiv
 '891, S. 248—254.

sich wieder andrängen. Es liegt nahe, zu vermuthen, dass jene Eiweisszersetzungsprodukte der Wirksamkeit eines trypsinartigen Enzyms ihre Entstehung verdanken. Einer solchen Annahme stehen aber die Ergebnisse entgegen, zu denen R. Neumeister¹⁾ in seiner auch von mir²⁾ früher schon erwähnten Untersuchung gelangte. Dieser Forscher suchte die Absorbirbarkeit eiweisslösender Enzyme durch frisches Blutfibrin zur Abscheidung solcher Enzyme aus den Pflanzenextracten zu verwerthen. In manchen Keimpflanzen konnte er auf diesem Wege in der That ein eiweisslösendes Enzym nachweisen; aber gerade bei den Keimpflanzen von Papilionaceen (Lupine, Wicke und Erbse) erhielt er negative Resultate und schliesst daraus, dass bei diesen Objecten ein solches Enzym fehlt.

Zu der entgegengesetzten Schlussfolgerung ist Green³⁾ durch die von ihm an Lupinenkeimpflanzen gemachten Versuche gekommen; er erklärt, dass diese Keimpflanzen ein eiweisslösendes Enzym enthalten. Neumeister (loc. cit.) hält Green's Versuche nicht für beweisend und meint, dass die verdauende Wirkung des von Green verwendeten Glycerinextracts aus Lupinenkeimpflanzen auf Rechnung der zugefügten 0,2% Salzsäure zu setzen sei; denn auch 0,2%ige Salzsäure vermöge ohne Gegenwart von eiweisslösendem Enzym aufgequollenes Fibrin bei Körpertemperatur langsam unter Peptonbildung zu lösen. Doch ist darauf hinzuweisen, dass Green Kontrolversuche ausführte, um sich gegen einen Irrthum solcher Art zu sichern, und dass er ferner die Bildung krystallinischer Zersetzungsprodukte bei Einwirkung seines Glycerinextracts auf Eiweissstoffe beobachtete — eine Erscheinung, die doch wohl nicht der Wirkung der 0,2%igen Salzsäure zugeschrieben werden kann.

Um einen Beitrag zur Lösung dieser Frage zu liefern, hat W. Butkewitsch in meinem Laboratorium Versuche nach

1) Zeitschrift für Biologie, 1894, S. 447.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 420, Anmerkung 2.

3) Proceeding's Royal Society, 1890, Bd. 41, S. 466.

einem Verfahren angestellt, welches von den bisher angewendeten verschieden ist. Diese Versuche, über deren Resultate vor Kurzem schon eine vorläufige Mittheilung¹⁾ erfolgt ist, scheinen zu einer völligen Bestätigung der Schlussfolgerung Green's zu führen. Demnach scheint das von Neumeister zur Abscheidung des eiweisslösenden Enzyms aus den Extracten angewendete Verfahren für die Keimpflanzen der Papilionaceen nicht brauchbar zu sein.

Es ist zu hoffen, dass die von Butkewitsch in Aussicht genomme Fortsetzung seiner Versuche zur völligen Aufklärung dieser Frage führen wird. Von grossem Interesse wird es sein, zu prüfen, ob das in den Papilionaceen-Keimpflanzen vorhandene Enzym Asparagin zu bilden vermag. Green gibt an, dass unter den durch dieses Enzym aus Eiweissstoffen gebildeten Produkten asparaginähnliche Krystalle sich vorfanden; doch gibt er keinen Beweis dafür, dass diese Krystalle wirklich Asparagin gewesen sind.

Sowohl in dieser Abhandlung als auch früher schon habe ich es für möglich erklärt, dass ein Theil des in den Keimpflanzen sich vorfindenden Asparagins bei der Spaltung der Eiweissmoleküle direkt entstanden ist. Letzteres würde als bewiesen zu betrachten sein, wenn es gelänge, zu zeigen, dass bei Einwirkung des in den Keimpflanzen enthaltenen Enzyms auf Eiweissstoffe Asparagin entsteht. Die bis jetzt hier ausgeführten Versuche haben keine Entscheidung dieser Frage gebracht, ihre Resultate scheinen aber schon vollständig die Annahme auszuschliessen, dass jener Quelle eine bedeutende Asparaginmenge entstammt.

1) Berichte der d. Botanischen Gesellschaft, 1900, Juni-Heft.

Zur Aciditätsbestimmung des Urins.

Von

Dr. Otto Naegeli,

gew. Assistenzarzt der Klinik.

Z. Z. I. Assistenzarzt der medic. Poliklinik in Zürich.

(Aus der medicinischen Klinik der Universität Bern [Prof. Sahli].
(Der Redaction zugegangen am 29. Juni 1900.)

Die Bestimmung der im Urin ausgeschiedenen Säuremenge hat für den Einblick in eine Reihe von Krankheiten eine hervorragende theoretische wie praktische Bedeutung. Eine exacte Bestimmung der Acidose bei Diabetes, Gicht und anderen Stoffwechselkrankheiten, überhaupt die Kenntniss der durch den Eiweisszerfall entstehenden Säuremengen, wäre für Diagnose, Prognose und Therapie von nicht zu unterschätzendem Werthe. Dennoch liegen bisher nur wenige Untersuchungen auf diesem Gebiete vor, indem die meisten Autoren in Folge vermeintlicher oder vorhandener Schwierigkeiten sich überhaupt von einem tiefen Eingehen auf Aciditätsuntersuchungen haben abschrecken lassen, in der Voraussetzung, dass den bisher geübten Methoden eine genügende Sicherheit der erhaltenen Resultate abgehe, und dass die Technik der Acidimetrie des Urins erst noch gefunden werden müsse.

Die folgenden Untersuchungen bezweckten eine eingehende nochmalige Prüfung der bisher geübten und vorgeschlagenen Methoden der Acidimetrie des Urins und sollten dazu führen, eine für klinisch praktische Zwecke genügende und möglichst einfache Bestimmung zu finden und ihre für diesen Zweck ausreichende Genauigkeit zu beweisen. Es war nun allerdings

findung einer vollkommen exacten Methode der Aciditätsbestimmung für eine derart complicirte Lösung, wie sie der Urin darstellt, auf ausserordentliche, vielleicht unlösbare Schwierigkeiten stossen würde; allein es haften allen unsern Untersuchungsmethoden gewisse Fehler an, und dennoch lassen wir uns vor ihrer Anwendung nicht abschrecken, sofern ihre Resultate nicht allzu sehr von der mathematischen Grösse abweichen. Ganz ähnlich könnte es sich auch in Betreff der Schwierigkeit, exacte Resultate zu erzielen, bei der Aciditätsbestimmung des Urins verhalten, die bisher fast ausschliesslich vom theoretischen Standpunkt aus geprüft und, wie ich später zeigen werde, meist wegen Fehler als unbrauchbar verworfen wurde, die für praktisch klinische Zwecke kaum eine Rolle spielen. Wenn es aber gelingen sollte, eine Untersuchungstechnik zu schaffen und zu begründen, deren Fehler nicht grösser sind als diejenigen, welche wir bei den andern in der practischen Medicin üblichen Methoden tagtäglich begehen, so würde nichts im Wege stehen, diese Aciditätsbestimmung des Urins der Praxis einzuverleiben. Die folgenden, auf der medicinischen Klinik in Bern ausgeführten Untersuchungen, ihre kritische Besprechung und die sorgfältige Berechnung ihrer Fehler mögen einen Einblick gestatten, wie weit wir dem vorgestreckten Ziele nahe gekommen sind.

Die ersten Versuche, sich über den Säuregrad des Urins Rechenschaft zu geben, wurden wohl mit dem allgemein gebräuchlichen Lackmuspapier angestellt. Man musste sich indessen sehr bald überzeugen, dass damit etwas Zuverlässiges nicht gewonnen werden konnte, weil das I. und II. Alkaliphosphat,¹⁾ durch deren Anwesenheit die Reaction des Urins hauptsächlich bedingt wird, jedes für sich, und zwar entgegengesetzt, auf Lackmus reagiren. In Betreff einer ausführlichen Erörterung dieses Verhaltens verweise ich auf den spätern Abschnitt der Phosphattitration.

¹⁾ Im Folgenden sind primäre, secundäre und tertiäre (normale Salze, d. h. solche, in denen ein, zwei oder drei Wasserstoffatome durch Metalle ersetzt sind, als I. II. und III. Salz bezeichnet.

Stelle des principiell unbrauchbaren Lackmus nach andern empfindlichen Indicatoren zu suchen, welche jenes so störende Verhalten des Lackmus gegenüber den beiden Phosphaten nicht besitzen. Dies ist indessen nur in geringem Grade geschehen. Man hat versucht, durch Tinct. Coccionellae oder Phenolphthalein oder Corallin (Rosolsäure) bessere Resultate zu gewinnen; allein thatsächlich eingebürgert hat sich keines dieser Mittel, und es fehlte nicht an Stimmen, welche gegen die Anwendung derselben Opposition erhoben, insbesondere waren es die folgenden Factoren, welche die Brauchbarkeit der genannten Indicatoren verunmöglichen sollten: die Eigenfarbe des Harns, die Einwirkung der Carbonate und Ammoniumsalze, die alkalischen Erden; darüber später!

Eine grössere Arbeit von Freund und Toepfer (Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XIX) suchte allerdings durch eine ganze Menge von Indicatoren und die Empfehlung ihrer Zuverlässigkeit die empfundene Lücke auszufüllen. Vor Allem sollte das Alizarinroth S (alizarinsulfonsaures Natron) durch seine Farbenänderungen bei den verschiedensten Reactionsverläufen Aufschluss über Acidität und Alkalescenz zu geben im Stande sein.

Es wird unten bei der Titration der verschiedenen Salze Gelegenheit sich finden, auf diese von Freund und Toepfer empfohlenen Indicatoren und ihre Genauigkeit zurückzukommen. Hier genügt es anzuführen, dass bisher keine der von den beiden Autoren empfohlenen Methoden sich Anerkennung zu verschaffen gewusst hat, und dass auch sie zum Theil lebhafter Opposition begegnet sind.

Es entstand jetzt allmählich mehr und mehr die Ansicht, dass es wegen bedeutender Schwierigkeiten wohl überhaupt nicht gelingen werde, auf diesem Wege der Titration mittelst Indicatoren zum Ziele zu gelangen, und man sah sich deshalb nach Methoden um, die auf andern Principien basirten.

Eine solche auf ganz anderer Ueberlegung beruhende Bestimmungsart ist die sogenannte Maly'sche Methode (Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. 15 S. 417.) Dieselbe hat

n gebunden als $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ in
sung zu entfernen und ihre
Menge einer der Titration
Säure (Salzsäure) einnehmen
hode vergl. S. 325.

ehrbüchern ziemlich günstig
ie neueste Zeit als gering
r nur selten finden, dass
bestimmung Eingang ge-
zen werde, ist dies auch

ft f. physiolog. Chemie,
agen, nachdem er allen
enauigkeit vorgeworfen
ass die ganze Acidität
sphates abhängig sei,
n in entsprechender
Menge des I. Phos-
s, und zu seiner
nmung der beiden
h der bekannten
ure und nachher
n von Freund
as II. Phosphat
d abfiltrirt und
methode das
rechnet wird.
ern Abschnitt

e Verfahren
s Indicator
s Harnes
r mit HCl
fällt und
enthält
baryum-

Alkalis und der vorher zugesetzten Säuremenge resultire der Säuregehalt des Harns. Auf das Princip dieser Methode werde ich zurückkommen. Oliviero (Rep. de Pharmac., 1897, 7) titrirt den Harn direkt mit $\frac{1}{100}$ Normalkalilauge und benützt als Indicator Phenolphthalein. Das von Strobel construirte Urinacidimeter verwendet eine graduirte Röhre, Phenolphthalein und $\frac{1}{10}$ Normalkalilauge. Berlioz Lépineo und Michel (Chem. Ztg. Repertor., 1897) endlich setzen dem Urin Kalilauge zu und titriren den Ueberschuss derselben unter Verwendung von Phenolphthalein als Indicator mit Salzsäure. Die Harnacidität drücken sie in Gramm Salzsäure aus.

Bevor wir auf alle diese Bestimmungen eingehen, wollen wir uns zunächst Rechenschaft geben, was für Salze im Urin vorkommen, die für die Aciditätsermittlung in Betracht kommen.

Salze des Urins.

Ueber die Mengenverhältnisse der wichtigsten anorganischen Säuren und Basen im normalen Urin gibt eine Arbeit von Stadelmann (Archiv für experim. Pathologie, 17, 435) einen schätzenswerthen Aufschluss.

Darnach enthielte der Tagesurin (Mittel aus einer 5tägigen Periode)

9,850 g Cl 2,779 SO₄ 4,059 PO₄ — 0,405 C₅H₄N₄O₃ (Harnsäure).
2,593 „ K 5,478 Na 0,633 NH₄ 0,040 Ca 0,088 Mg.

Wenn wir aber, was für die Aciditätsfragen wichtig ist, diese Zahlen auf Aequivalenzwerthe umrechnen, so sind dieselben, H₂SO₄ als normales und H₃ PO₄ als II. Salz angenommen, die folgenden:

0,277 Cl 0,058 SO₄ 0,085 PO₄¹⁾ — 0,003 C₅H₄N₄O₃
0,066 K 0,238 Na 0,035 NH₄ 0,002 Ca 0,007 Mg.

Das Natrium genügt nicht ganz, um alles Cl zu binden. Die Summe der Säureäquivalente übersteigt also die der Basenäquivalente. Dabei ist das Aequivalenzverhältniss für PO₄ etwas zu hoch berechnet, weil im Urin auch I. Phosphat vorkommt.

¹⁾ In Huppert (Neubauer und Vogel), Harnanalyse 1898 entspricht der angegebene Aequivalenzwerth der PO₄ 0,043 dem I. und nicht, wie die Angabe lautet, dem II. Phosphat.

vor, und vermehren also die
Kohlensäure, Hippursäure.

sich im Harn theils als freie
Liter Urin ist nach Planer
Wiener Aerzte 1859, 465) im
und 30,7 ccm. gebundene
zer (Pflüger's Archiv Bd. 2.
Werthe 180 und 5 ccm.
die Angaben der Autoren
t sind wir über die Car-
s noch ganz ungenügend

als II. Salz vorkommen.
ng mit dem I. Phosphat

ei gewöhnlicher Tem-
reichen.
folgende Verhältnisse

vor. Die Mengen-
kommen für die
sehr in Betracht.
ark sauer. Dabei
gleichzeitig viel

ängt in erster
ht ausschliess-
andere saure
v. f. Biologie,

so verhält
hat, indem
re auftritt.
1 freiem

en (und

mit freiem Alkali fallen die alkalischen Erden zunächst aus als II. Phosphate.

Wird das I. Phosphat einer alkalischen Erde mit NaOH behandelt, so entsteht II. und III. Phosphat der alkalischen Erde.

Mit den Salzen der alkalischen Erden, z. B. BaCl_2 , das neutral reagiert, entsteht aus I. Natriumphosphat das I. Baryumphosphat, das in Lösung bleibt, aus II. Natriumphosphat aber entsteht II. Baryumphosphat, das als Niederschlag ausfällt.

Wird nun einer Lösung des I. und II. Alkaliphosphates das Salz einer alkalischen Erde zugefügt, so erfolgt ein Niederschlag des entsprechenden Erdalkalisalzes aus dem II. Alkalisalz. Diese Umsetzung erfolgt aber nicht quantitativ. Dies geschieht angeblich nur bei saurer Reaction der Flüssigkeit (Huppert, Neubauer und Vogel, Harnanalyse).

Wie sich hierbei das I. Alkaliphosphat verhält, ist bisher nicht gezeigt worden. Ich werde auf S. 331 darauf eingehen.

Mit sehr stark überschüssigen Alkalien bilden Phosphatlösungen endlich tertiäre und basische Phosphate, z. B. $2 \text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ba}(\text{OH})_2$ (Lieblein).

Die Chloride bieten nichts Besonderes.

Die Sulfate kommen vor als saure I. und als neutrale II. Salze; ausserdem ist ein Theil und zwar etwa $\frac{1}{10}$ als ätherschwefelsaure Salze im Urin enthalten.

Ueber die Menge der im Urin enthaltenen sauren Sulfate vermisst man jede Angabe. Wegen der grossen Affinität der Schwefelsäure zu den Alkalien dürfte indessen die Menge der sauren Sulfate eine sehr geringe sein.

Harnsäure enthält der menschliche Urin etwa 0,2—1,2 g im Tage. Im frischen Urin grösstentheils als Biurat vorhanden, entstehen je nach der Menge der gleichzeitig vorhandenen sauren I. Phosphate Umsetzungen, wobei ein Theil der harnsauren Salze als freie Harnsäure und als Tetraurat ausfällt. Darüber, sowie über die Rolle, welche dabei das II. Natrium-

— 320 —

phosphat spielt, vergleiche die wichtige bereits citirte
von Ritter.

Wesen der Aciditätsbestimmung.

Die Aciditätsbestimmung bezweckt in erster Linie, den Ueberschuss der Säureäquivalente über die Basenäquivalente zu ermitteln, denn das ist die Acidität des Urins im gewöhnlichen Sinne. Wenn wir also einer bestimmten Harnmenge soviel $\frac{1}{10}$ Normallauge zusetzen, bis neutrale Reaction erzielt ist, so wissen wir, dass die gefundene Alkalimenge der überschüssigen $\frac{1}{10}$ Normalsäureäquivalentmenge gleichkommt. Daraus lässt sich dann mit Leichtigkeit die für den Tagesurin nöthige Alkalimenge und daraus endlich die Gesamtaacidität pro die berechnen. Dieselbe wird dann vortheilhaft in Grammen reiner Oxalsäure oder Salzsäure ausgedrückt.

Man titirt also auf den Neutralisationspunkt. Da-
runter verstehe ich jenen Punkt einer Salzlösung, bei welchem auf Zusatz einer Spur Säure die Lösung gegenüber Indicatoren sauer und auf Zusatz einer Spur Base alkalisch reagirt. Als bester Indicator hat sich dafür Phenolphthalein herausgestellt, weil derselbe für Salzlösungen dem theoretisch auf chemischem Wege ermittelten Neutralisationspunkte ungemein nahe kommt.

Die Acidität ist also der Ueberschuss der Säuremengen einer Lösung über ihren Neutralisationspunkt.

Mit der Bestimmung der Harnacidität, die also einen relativen Begriff darstellt, ist über die vom Körper ausgeschiedene Säuremenge selbst noch gar nichts gesagt. Wenn der Urin sehr viel Säuren enthält, dabei aber auch gleichzeitig viel Alkalien, so kann seine Acidität gering sein und durchaus nicht auf eine grosse Menge ausgeschiedener Säuren schliessen lassen. In diesem Falle kann erst die gleichzeitige Bestimmung

Basen uns über die thatsächliche Menge der Säuren

Bestimmung der Acidität sollte ihrem ganzen Wesen nach Methode diejenige sein, die titrimetrisch bis alle sauren Salze in Neutralsalze

Diese Bestimmung könnte vom theoretischen Standpunkte aus unter 2 Bedingungen unrichtig sein:

erstens, wenn beim Zusatz der Lauge die im Urin vorhandenen sauren Salze nicht einfach in neutrale verwandelt würden, sondern die chemischen Veränderungen complicirter wären und sich gegenüber Indicatoren nicht chemisch genau verrieten;

zweitens, wenn die vorhandenen Indicatoren entweder nicht genau die erste Bildung alkalisch reagirender Salze anzeigten, oder doch einen undeutlichen Farbenwechsel aufwiesen, dessen Eintritt schwierig zu erkennen wäre.

Alle diese Einwände sind in der That gemacht worden.

Den ersten derselben hat vor Allen Lieblein (l. c.) hervorgehoben, und auf seine Angaben hin ist von mehreren Lehrbüchern die Titration der Harnacidität mittelst Natronlauge und Indicatoren als principiell unrichtig verworfen worden. Der genannte Autor behauptet nämlich, dass beim Zusetzen von NaOH zum Urin nicht einfach das in demselben vorhandene I. Calciumphosphat in II. neutrales¹⁾ Salz sich verwandle nach der Formel



sondern dass complicirtere Verbindungen von wechselnder Zusammensetzung entstünden. Wahrscheinlich denkt der Autor, dass auch III. Salze resultiren, wodurch allerdings zu viel Lauge verbraucht würde.

Die unten angeführte Titration des I. Calciumphosphates wird indessen an Hand der chemischen Berechnung die Genauigkeit der Umsetzung ergeben. Aber selbst angenommen, dass bei der Anstellung der Probe am Urin complicirtere Verbindungen resultirten und, wie Lieblein anzunehmen scheint, sogar gleichzeitig mit sauren Phosphaten in Lösung vorkommen sollten, so könnten dieselben doch nur basisch sein und müssten sich ihrer Alkalescenz gemäss gegenüber

¹⁾ Na_2HPO_4 ist nicht neutral, andere II. Phosphate z. B. des Ca sind es; daher bezeichnet man wohl die II. Salze als neutral. Es kann dies aber nur den Sinn haben, dass sie in der Mitte zwischen sauren und basischen Salzen stehen (theoretisch neutrale Salze).

wenn nicht mehr Lauge angewandt wird, als zur Bildung der II. Salze nöthig ist, solche basische Verbindungen gar nicht entstehen können. Wiederum angenommen endlich, dass sie doch möglich sein sollten, selbst noch bei Anwesenheit saurer Phosphate, so müsste ihre Alkalëscenz die entsprechende Menge saurer Salze für den Indicator paralysiren. Nun kommt aber noch dazu, dass die Menge des Gesamttcalciums (s. S. 317) eine ganz verschwindende ist und nicht einmal $\frac{1}{150}$ des Aequivalentes von Natrium und Kalium beträgt. Erst recht aber muss die Menge des I. Calciumphosphates, das hier in Frage kommt, gering sein, so dass ein auf dieser Basis etwa beruhender Fehler für die Bestimmung an 10 ccm. Urin für unsere Methode längst unmessbar wäre, selbst wenn man ihn noch als bestehend annähme, was mir keineswegs als bewiesen erscheinen will.

Ganz ähnlich verhält es sich mit der nur in etwas andere Form gekleideten These Lieblein's, dass die Titration des Harns mit Lauge nicht gelingt wegen des Ausfallens der alkalischen Erden, indem aus einer Mischung von Na-, K-, Ammonium-, Mg-, Ca-Phosphaten zuerst die Erdalkalien ausfallen. Wie Lieblein selbst angibt, fallen Ca und Mg als II. Salze aus, was gar nichts ausmacht, so lange nicht III. Phosphate der Erdalkalien gebildet werden. Erst wenn auch alle Alkaliphosphate der ersten Gruppe in II. Phosphate verwandelt sind, beginnt alkalische Reaction, dem Ueberschreiten des Neutralisationspunktes entsprechend. Selbst wenn man noch zugeben will, dass Phenolphthalein gegenüber diesen Salzen nicht so scharfe Reaction gibt, so sind doch diese Erdalkalien im Harn in so verschwindender Menge vorhanden, dass ein daraus entstehender Fehler unsern Methoden völlig entginge und praktisch ausser jede Berücksichtigung fiel.

Stehen also dem Princip der Acidimetrie des Urins keine Schwierigkeiten entgegen, so treffen dafür die Anwendung des von mir später als einzig geeignet empfohlenen Phenolphthaleins wiederum eine Reihe principieller Einwände. Der Indicator soll ungeeignet sein, weil er durch Kohlensäure

saure Reaction gegenüber Phenolphthalein schon eintritt durch die freiwerdende CO_2 , bevor die Base ganz an die zugesetzte Säure gebunden wird. In Folge dessen ist in der That das Phenolphthalein nicht geeignet, um das Auftreten freier Säure zu bestimmen, weil CO_2 schon auf dem Wege der Umwandlung des II. Salzes frei wird, bevor neben ausschliesslich sauren I. Salzen die erste freie Säure auftritt.

Vergleichen wir nun die Titration der Carbonate, so gibt in der That Phenolphthalein die in Lösung befindliche CO_2 an. Dies ist aber ein ganz ausgezeichneter Vorthail! (Vergl. Titration der Carbonate S. 342). Die Kohlensäure der Carbonate spielt ja die Rolle einer Säure; denn es kommt für die Feststellung der Acidität nicht darauf an, ob eine Säure stark oder schwach sei, sondern darauf, dass sie Alkalien binde, und dies thut eben die Kohlensäure. Wäre es nämlich nicht der Fall, so müsste ja der Aequivalenzwerth der Alkalien steigen, der Harn wäre weniger sauer, die Menge der sauren Salze würde vermindert. So wird in der That durch die Zersetzung der Carbonate beim Stehen des Harns CO_2 an die Luft abgegeben (Huppert, Harnanalyse), die sauren Phosphate und Urate nehmen dementsprechend ab und es entstehen II. Salze. Dies dürfte genügen, um die Bedeutung der Carbonate richtig zu beurtheilen.

Für die Acidimetrie des Urins kommt aber die ganze Frage wegen der Kohlensäure gar nicht in Betracht, weil ja beim Zusetzen von Alkali kein CO_2 frei wird. Ein Einwand gegen die acidimetrische Bestimmung kann also von dieser Seite aus nicht gemacht werden, und für die Alkalimetrie, bei der nun thatsächlich mit diesen Verhältnissen gerechnet werden müsste, ist Phenolphthalein ohne Weiteres schon ungeeignet, da es den Uebergang von sauren Salzen zu freier Säure nicht angibt.

Es sollen ferner die Ammoniumsalze mit Phenolphthalein als Indicator nicht titirbar sein. Der Versuch ergibt allerdings einen etwas weniger prägnanten Farbenwechsel; doch kann daraus ein nennenswerther Fehler nicht entstehen.

catoren der Einwand erhoben worden, dass die im Urin vorkommenden Salze, also vor Allem das Natriumphosphat, nur theoretisch neutrale,¹⁾ thatsächlich aber alkalisch reagirende II. Phosphate bilden. Daraus entsteht nun in der That ein Fehler, indem der Indicator alkalische Reaction schon etwas früher angibt, als die Bildung alles II. Phosphates vollzogen ist, und für die Berechnung des Ueberschusses der Säureäquivalente muss der Ablauf der Reaction verlangt werden. Für die im Urin überhaupt vorkommenden Phosphatmengen (normale und pathologische Fälle mitgenommen) macht nun dieser Fehler ganz wenig aus; für 10 ccm. Urin etwa 2 Tropfen = $0,1 \frac{1}{10}$ N.-NaOH. Er verwandelt sich aber geradezu in einen Vortheil, indem wir daraus ersehen, dass wir nicht auf die erste leichte Farbenänderung, sondern etwas darüber hinaus titriren sollen, und dann ist der erfolgte Umschlag viel leichter zu beurtheilen. Dass für die Titration an etwas dunklen Urinen daraus nur ein Vortheil resultirt, ist offenkundig.

Es ist jetzt noch Einwänden zu begegnen, die nicht wegen chemischer, sondern mehr wegen physikalischer Gründe die Acidimetrie des Urins verunmöglichen wollten. Dahin gehört vor Allem die hervorgehobene störende Eigenfarbe des Urins. Dieser Einwand ist berechtigt, spielt aber eine Rolle doch nur in einer kleinen Zahl der Fälle. Dann lässt sich immer noch durch Verdünnung mit Aqua destillata, im Nothfall Filtrirung durch Thierkohle,²⁾ die Schwierigkeit heben.

Von Arbeiten über die Acidität des Urins, welche von der Ansicht ausgehen, dass die angeführten Schwierigkeiten einer titrimetrischen Bestimmung der Harnacidität theils nicht bestehen, theils kein absolutes Hinderniss für die praktische Verwerthung derselben bilden, erwähne ich die beiden aus

1) Das heisst, das Wort neutral hat mit der Reaction gar nichts zu thun, ist nur ein chemischer Begriff.

2) Gewöhnliche Thierkohle darf nicht benützt werden, da sie viele Basen enthält und stark Säuren bindet. Die Chemiker benützen deshalb besonders präparirte neutrale Thierkohle.

den Einfluss von Säure- und Alkalizufuhr auf die Alkaleszenz des Blutes und die Acidität des Harns (Virchow's Archiv 1891) und von Frl. Kalantarianz über den Einfluss der Nahrung auf die Säureausscheidung im Harn und über den absoluten Betrag dieser letzteren unter physiologischen Verhältnissen (J. D. Bern, 1894).

Gestützt auf diese beiden Arbeiten erklärt Prof. Sahli in seinem Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden, II. Auflage 1899, die Methode der Titration des Urins mit Phenolphthalein für klinisch brauchbar. Ausserdem erwähne ich von rein titrimetrischen Untersuchungen das Werk von Haig, Uric acid as a factor in the causation of disease 1897, welches neben mancherlei absonderlichen und unrichtigen Anschauungen doch auch manche interessante und wichtige That-sachen enthält.

Die vorliegende Studie soll zu den beiden erwähnten Arbeiten der Berner medicinischen Klinik die erforderliche methodisch kritische Ergänzung bilden.

Im Folgenden sollen nun zunächst diejenigen Methoden erprobt werden, welche die direkte Titrirung mit Laugen und Indicatoren vermeiden. Da es sich dabei gezeigt hat, dass diese Bestimmungsarten, soweit sie sich in praxi gestalten, erhebliche Fehler aufweisen, so soll neuerdings die direkte Acidimetrie geprüft werden. Es mögen zuerst reine Lösungen der im Urin vorkommenden Salze, dann Mischungen mit den verschiedenen Indicatoren auf die Genauigkeit der Acidimetrie untersucht werden.

I. Die Maly'sche Methode der Aciditätsbestimmung des Urins.

Mit Rücksicht auf die Schwierigkeiten, welche die Titration von Salzmischungen bietet, in denen Phosphate vorhanden sind, hat Maly (Zeitschrift f. analyt. Chemie 15, 417) versucht, die Phosphate mit BaCl_2 als unlösliches III. Baryumsalz aus der Lösung zu entfernen und die hierfür nöthige Alkalimenge zu berechnen.

Die Ausführung erfolgt in der Weise, dass zu einer nicht

atronlauge zugegeben wird,
es III. Phosphates nöthig ist
nd jetzt BaCl_2 (z. B. 10 ccm.

Es entsteht ein weisser
es, der bei der nun folgen-
bt. Es wird zunächst die
'er Hitze²⁾ nunmehr mit
ators titirt, so zunächst
zten Alkalis bestimmt,
endeten und der über-
e angibt, die zur Bil-
stufe des III. Baryum-

aufgenommen und als
uantitative Analyse;
'98, Nr. 24); Lieb-
man zur Bildung
e, und zwar umso-
m sich Doppelver-
1. Als die basen-
uge nach Lieb-
etzen von mehr
also mit Berück-
werthen; allein
lie das ganze
lass Lieblein

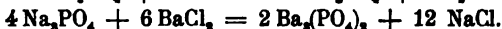
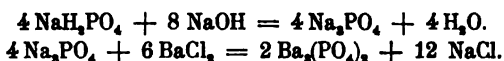
blein's an-

ösung von
und einem

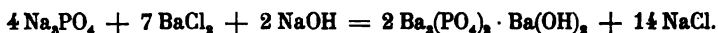
entweicht,

Luft zu

$\frac{1}{10}$ Normalnatron, wobei die Reaction nach den Formeln verlief:



Für die Herstellung des Lieblein'schen Salzes aber müsste nach dem Formelablauf:



2 NaOH auf 8, also $\frac{1}{4}$ mehr verlangt werden, mithin 9,06 ccm. $\frac{1}{10}$ Normalnatron.

Ein kleineres Quantum als 20 ccm. NaOH gab in der That sofort stark divergirende Resultate; mit der angeführten Menge aber betrug die verbrauchte Natronlauge oft 9,1—9,2 ccm. und sprach also für den von Lieblein dargestellten Reactionsverlauf. Ich muss aber bemerken, dass ich trotz des sorgfältigsten Vorgehens mitunter stärker abweichende Ziffern erhielt, so dass es allem Anscheine nach zu noch complicirteren, aber inconstanten Verbindungen kommen muss.

Suchte ich nun den entstandenen Niederschlag abzufiltriren und durch sorgfältiges Auswaschen des Filters jeden Laugenverlust zu vermeiden, so ergab das Filtrat wiederum andere und unter sich noch divergente Resultate. Es war das Filtrat allerdings völlig frei von P_2O_5 , aber die Acidimetrie stellte fest, dass das Filtrat gegenüber der unfiltrirten Mischung um 2—2 $\frac{1}{2}$ ccm. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH ärmer war, worauf meines Wissens bisher nicht aufmerksam gemacht wurde.

Wie erklärt sich diese Differenz? Aus der Titration an der unfiltrirten Mischung und der dabei erhaltenen Grösse des Laugenverbrauchs geht hervor, dass selbst bei der Titration mit Salzsäure das Lieblein'sche Doppelsalz nicht gesprengt wird. Ganz selbstverständlich kann es bei der Filtration nicht zerlegt werden. Das Zurückbleiben von noch mehr Lauge, als durch das Doppelsalz bedingt ist, kann daher nur erklärt werden entweder durch mechanisches Zurückbleiben von Alkali im Filter trotz mehrfachen Ausspülens, oder durch die Bildung noch complicirterer, noch höher basischer Verbindungen, die aber bei der Filtration an der unfiltrirten Mischung durch HCl

Filter zurückbleiben.

Dem ersten Factor ist ganz gewiss eine gewisse Rolle zuzuschreiben. Das geht schon aus der Inconstanz der erhaltenen Werthe am Filtrat, je nach der stärkeren oder geringeren Ausspülung hervor, dann aber auch aus der vielfach constatirten Thatsache, dass es nicht gelingt, ein kleineres Flüssigkeitsquantum einer Salzlösung trotz wiederholten Nachspülens ohne Verlust zu filtriren. Dass aber auch dem zweiten Factor eine gewisse Rolle zuzuschreiben ist, scheint mir durch die Grösse des Verlustes, welcher das sonst gewöhnliche Maass erheblich überschreitet, nahegelegt zu sein.

Aus Allem aber ergibt sich die Complicirtheit des Reactionsverlaufes, der sich gar nicht hinreichend genau und constant bestimmen lässt.

Es sind für die Titration bei der Maly'schen Methode verschiedene Indicatoren vorgeschlagen worden: Rosolsäure (Fresenius), Methylorange (Lieblein). Am besten von allen bewährte sich mir noch Phenolphthalein.

Die analoge Titration des Na_2HPO_4 lieferte auch unbefriedigende Resultate. Unfiltrirt titrirt blieb die Menge der verbrauchten NaOH stets unter der berechneten Grösse; am Filtrat stimmte sie annähernd, aber nicht exact für den Lieblein'schen Reactionsablauf.

Ich habe kaum nöthig, nunmehr noch zu versichern, dass auch die Methode an der Mischung der Phosphate und hier natürlich erst recht ungenaue und inconstante Resultate ergab, und dass auch bei der Anwendung für den Urin befriedigende Ergebnisse nicht erzielt wurden.

So muss ich denn der Methode jeden Werth für die klinische Aciditätsbestimmung absprechen:

sie ist nicht besonders einfach (Lieblein arbeitete unter Abschluss der Luft wegen der Kohlensäure derselben!);

der Reactionsverlauf ist complicirt und unberechenbar;
die erhaltenen Resultate sind ungenau und weichen unter sich viel zu erheblich ab;

trieben, die Menge der Saureäquivalente daher zu klein.

Noch einen Nachtheil aber möchte ich der Methode vorwerfen: sie bestimmt gar nicht die eigentliche Acidität, sie führt ja nur das I. und II. Phosphat in III. und alkalische Verbindungen über. Selbst wenn nun die hierzu nöthige Laugenmenge eine leicht zu berechnende Grösse wäre, so wäre ja noch immer für die Acidität des Urins gar nichts gewonnen, weil über Menge des I. Phosphates, das ja die Säure des Harns im Gegensatz zum II. Phosphat ausmacht, uns immer noch jeder Anhalt fehlte. Die Methode bestimmt also nur die Basencapazität des Urins.

Eine leichte Modification der Maly'schen Methode von Neumeister (Lehrbuch d. physiol. Chemie, II. Aufl.), der für die Titration das Filtrat und ausserdem statt $\frac{1}{10}$ N.-HCl eine $\frac{1}{10}$ N.-Schwefelsäure gebraucht, erwies sich nach meinen Versuchen nicht als geeignet, die im Vorigen geschilderten Fehler zu vermeiden.

II. Methode der Aciditätsbestimmung nach Lieblein-Freund durch Bestimmung der Phosphate.

Nachdem ich bereits oben (S. 316) auf das Princip der Methode eingegangen, möchte ich hier das Specielle derselben ausführen.

Die Bestimmung der Phosphate mit der Uranmethode gilt in allen Lehrbüchern der analytischen Chemie als ein ausgezeichnetes und genügend einfaches Verfahren. Dasselbe gestaltet sich wie folgt:

Man versetzt die Phosphatlösung mit $\frac{1}{10}$ ihres Volumens einer Essigsäuremischung (Natr. acetic. pur. cryst. 1,0 in Aq. dest. 10,0 aufgelöst, Acid. acetic. glac. 1,0), erhitzt zum Sieden auf dem Wasserbade und titrirt mit der käuflichen Urannitratlösung (Merck, Darmstadt), von der 1 ccm. 0,005 P_2O_5 anzeigt. Die Titration erfolgt in der Hitze und ist vollendet, wenn so viel Uran zugesetzt ist, dass ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit Ferrocyanalkalilösung, die auf einer Porzellanplatte ausgegossen ist, eben bräunt. Man erhitzt darauf die Flüssigkeit nochmals und macht die Kontrollprüfung. In neuerer Zeit wird als noch

r von der Exactheit der Methode
es sich darum handelt, einfach den
zu bestimmen:

halten P_2O_5 , berechnet 0,0514 g

z. Gefunden 10,25—10,30.

halten P_2O_5 , berechnet 0,0199 g

z. Gefunden 3,95—4,00.

gen enthält P_2O_5 0,0713 g

gefunden 14,25—14,30 ccm.

ngt es also, die Phosphate
für die Acidität des Harns
en. Erst wenn es gelänge,
n, das nach allen Autoren
ster Linie ausschlaggebend
weiter gekommen. Dies
II. Phosphate nach
medic. Wissenschaften,

Es entsteht ein un-
und zwar soll nach
Mit NaH_2PO_4 tritt
Gemisch der beiden
 Na_2HPO_4 ausgefällt.
säure und aus der
verfahren in Lösung
hat angehört, er-
d II. Phosphates

g der Reaction
z befindlichen
dies auf Ver-
zt, dass der
igungen her-
dass neben
 NaH_2PO_4 ?)



Salz abgezogen und dem zweiten zugezählt werden.

Um über die Exactheit der Methode mich zu orientiren, habe ich zunächst das Verhalten der Alkaliphosphatlösungen bei Zusatz von BaCl_2 untersucht.

Versetzt man 5 ccm. einer chemisch genauen 1%igen Lösung von NaH_2PO_4 mit BaCl_2 , so entsteht kein Niederschlag, sondern das sich bildende I. Baryumphosphat $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ bleibt in Lösung. Die titrimetrisch festgestellte Acidität der Lösung aber hat sich geändert; sie ist gestiegen. Je mehr BaCl_2 zugefügt wird, um so mehr steigt die Acidität, bis sie auf Zugabe von 10 ccm. 10%igem BaCl_2 sich nicht mehr ändert und nun constant 7,3–7,4 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal- NaOH ausmacht. Diese Ziffer entspricht einer Verdoppelung des Säurewerthes.

Den Herren Prof. Bamberger in Zürich und Prof. Meyer in Braunschweig verdanke ich die Erklärung dieser auffallenden Thatsache. Bei der Titration des NaH_2PO_4 mittelst NaOH in Gegenwart des BaCl_2 entsteht nämlich Na_2HPO_4 , das sofort mit BaCl_2 BaHPO_4 bildet und ausfällt, bei der weiteren Titration aber nochmals ein NaOH zur Bildung des III. Salzes BaNaPO_4 bzw. $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ und Na_3PO_4 absorbirt. Die grosse Neigung des BaHPO_4 zur Bildung des III. Salzes ist also die Ursache des Verbrauches eines zweiten Moleküls NaOH , mithin der scheinbaren Verdoppelung der Acidität.

Die Gegenwart von BaCl_2 bei der Titration ist also unter allen Umständen unzulässig!

Es ergaben sich aber bei der weiteren Ausführung der Lieblein-Freund'schen Methoden noch andere Schwierigkeiten:

Wird jetzt die Mischung von 5 ccm. 1%iges NaH_2PO_4

¹⁾ Ich bezog alle Substanzen chemisch rein von Merck. Darmstadt, wog mir z. B. 2,000 g auf der chemischen Waage ab und setzte chemisch reine Aqua destill. 200,0 ccm. mittelst feiner Expressionspipette zu. Darauf prüfte ich den Aciditätsgehalt der Lösung, ob er dem chemisch berechneten entspreche, und wenn dies der Fall war, so versicherte ich mich bei den Phosphaten noch mit der Uranmethode, dass auch der P_2O_5 -Gehalt genau dem chemisch berechneten gleich kam.

das erhaltene Filtrat weniger
3 selbst ergibt, dass dasselbe
und zwar ungefähr so viele,
wird sich deshalb um eine
1, weil dieselbe bei jeder
en Nachspülens, und weil
möglich erscheint, da das
t leicht löslich sind.

t durch die Untersuchung
mlich, dass das Filtrat
einem P_2O_5 -Gehalt ent-
verlangt, sondern nur
destens 6% beträgt.
: das Filter selbst bei
weist.

lass nach mehr als
einer wird; dadurch
und zeitraubend,
äre; aber es wird
un noch grössere
erth der Methode

nicht die er-
%iger Lösung
einen starken
aller Autoren
That ist das
r fließt es
des Nieder-
fangs ge-
inlich.

as gleiche
zurück-
ter ge-
Nieder-

Stehen eintreten sollte, dürfte das Filtrat keine Phosphorsäure mehr enthalten und sollte weder sauer noch alkalisch reagieren.

Mehrere Proben aber ergaben eine Acidität des Filtrates gegenüber Phenolphthalein zwischen 0,1 und 0,2 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-NaOH. Gegenüber Alizarinroth trat sofort eine eigenthümliche Trübung in Flocken auf (wegen des BaCl_2), ganz wie beim Versetzen des Urins mit diesem Indicator.

Aber auch Phosphorsäure ist im Filtrat, und zwar braucht man zu ihrer Bestimmung 0,4—0,7 ccm. Uranlösung. Mithin entsteht bei der Reaction ein Phosphorsäureverlust, der bei den verschiedenen Proben verschieden ausfällt und ca. 6% beträgt.

Jedenfalls geht aus der ganzen Untersuchung mit Bestimmtheit hervor, dass die Trennung der I. von den II. Phosphaten auf diese Weise mit gewissen nicht unerheblichen Fehlern verbunden ist. In der That ergibt denn auch das Lieblein-Freund'sche Verfahren an einer Mischung von 5 ccm. 1%iges NaH_2PO_4 und 5 ccm. 1%iges Na_2HPO_4 statt des berechneten P_2O_5 -Gehaltes von 4,0 Uranlösung, welchen das Filtrat bei idealer Trennung haben sollte, einen Verbrauch von 5,0 ccm. Uranlösung, mithin einen Fehler von 25%!, der noch ausserdem völlig jeder Berücksichtigung sich entzieht, als er an verschiedenen Proben verschieden stark ausfällt. — Die Einführung eines bestimmten Fehlerwerthes, wie z. B. der von Lieblein vorgeschlagenen 3%, ist aber schon deshalb unzulässig, weil ein solcher ganz ausserordentlich von den Mengeverhältnissen der vorhandenen I. und II. Phosphate abhängig ist.

III. Die Kritik der empfohlenen Aciditätsbestimmungen führt uns zu dem Verfahren von de Jager. Nach diesem Autor setzt man dem Urin eine bekannte Menge Salzsäure und sodann BaCl_2 zu, filtrirt den Sulfatniederschlag ab und titirt jetzt mit NaOH, bis ein Niederschlag von ausgefälltem BaHPO_4 entsteht. Die nöthige Menge Alkali übertrifft die vorher zugesetzte Säuremenge und dieser Ueberschuss soll

oder entstehen viele Bedenken;
sind mir die folgenden zu sein:
1. bedingt immer einen Fehler.
2. nicht die Sprengung der Carbo-
3. zum Theil in die Luft über-
4. Säureäquivalente einen Verlust
5. an des Niederschlages von
6. gen zu erkennen, wodurch
7. an wird.

Michel übersättigen den
Anwesenheit von Phenolph-
nach die starke Lauge
H₂, theilweise verloren
Ausserdem werden die
Verbindungen übergeführt
verloren.

1. darf man sich mit
Titration des Urins
2. s um so mehr zu
3. gen Methoden um-
4. durchzuführende

zunächst an ein-
geht werden.

ragen.

reagiert sauer.
nach Na_2HPO_4
Lauge muss
der Formel

phat, das
mischer

quantitativen Ablauf der Reaction. Derjenige Indicator, der beim Anstellen der Reaction bei Zusatz von 3,625 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-NaOH einen deutlichen und scharf einsetzenden Farbenwechsel gibt, muss als genau und brauchbar bezeichnet werden.

Prüfen wir also von diesem Gesichtspunkte aus die verschiedenen Indicatoren.

Tinct. Lackmus. Schon bei 0,9 beginnt ein leicht bläulicher Farbenton, der immer deutlicher wird, mit 2,1 ist die Farbe stark blau, nimmt aber noch zu bis 3,5, worauf Mehrzusatz von NaOH fürs Auge den blauen Farbenton nicht mehr verändert.

Lackmuspapier (besonders empfindlich gemacht) nach Vorschrift von Huppert, bei 2,0 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal-NaOH wird rothes Lackmus gebläut, blaues geröthet, bei 3,0 rothes stärker gebläut, blaues kaum verändert, nur etwas blasser. Mit 3,5 rothes rasch gebläut, blaues bleibt gleich. Mit 4,0 rothes rasch tiefblau, blaues noch tieferblau.

Somit ist der gebräuchliche Lackmusfarbstoff vollständig ungeeignet. Nicht nur beginnt die Farbveränderung viel zu früh und ganz allmählich, sondern auch von einer sicher zu beurtheilenden Endreaction ist keine Rede.

Dieses Verhalten ist bekannt; es beruht darauf, dass die in der Phosphatlösung vorhandenen I. und II. Phosphate, ohne auf einander einzuwirken, jedes für sich gegen Lackmus reagiren. So entsteht sehr oft die amphotere Reaction. Huppert hat gezeigt, dass eine entschieden amphotere Reaction zu Stande kommt, wenn die Mischung 0,3—0,5 als zweifach und 0,7—0,5 als einfach saures Phosphat enthält.

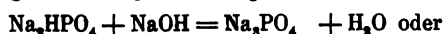
1) Molekulargewicht von $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 120, + \text{H}_2\text{O} = 18$, zusammen 138.
138 Gewichtstheile $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 1$ aq. enth. also nur 120 Gewichtstheile NaH_2PO_4
100 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 1$ 87 NaH_2PO_4
5 ccm. 1%iger Lösung von $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 1$ aq., mithin nicht 0,05, sondern
0,0435 g NaH_2PO_4
1 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal- NaH_2PO_4 enthält 0,0120 g NaH_2PO_4 , 0,0435 g entsprechen also 3,625 ccm. $\frac{1}{10}$ Normal- NaH_2PO_4 .

immer mehr violett, bei 6,0 schon stark violett, aber doch bei 7,0 noch ausgesprochener violett, ändert sodann nicht mehr. Der in anderer Beziehung ausgezeichnete Indicator ist für den Ablauf der in Frage stehenden Reaction nicht ganz genau und schwer zu beurtheilen. Gallein verhält sich ganz gleich.

Phenolphthalein, farblos, zwischen 3,55 und 3,6 $\frac{1}{10}$ N.-NaOH ganz scharf, mit einem einzigen Tropfen entschiedenes Auftreten einer Röthung, die bei 2—3 weitem Tropfen sehr intensiv wird.

Phenolphthalein ist mithin der einzige Indicator, der eine plötzlich und scharf eintretende Reaction gibt. Dagegen tritt die Reaction etwas vor dem chemischen Ablauf der Umlagerung auf. Ich werde auf diesen Punkt noch zurückkommen. Andererseits ist der Indicator nicht geeignet, das Auftreten freier Säure festzustellen.

b) Titration des II. Phosphates. Es reagirt alkalisch, ist theoretisch neutral. Da es mit 7 oder 12 Molekülen H_2O krystallisirt, so ergibt die chemische Berechnung für das von mir gebrauchte $Na_2HPO_4 + 12aq.$, dass 5 ccm. einer chemisch genauen 1%igen Lösung für den quantitativen Reactionsverlauf



1,394 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH oder $\frac{1}{10}$ N.-HCl nöthig haben.

Lackmustinctur. Reagirt alkalisch. Mehr NaOH macht die blaue Farbe nicht anders. HCl verursacht mit 0,6 allmählich Röthung, die von 1,0 an vollendet ist. Unverwerthbar.

Ihr ungefähr entsprechend Lackmuspapier.

Corallin, blauroth, mit NaOH unverändert, mit 0,2HCl Uebergang zur Rothfärbung, mit 0,4 ausgesprochen roth. Unbrauchbar.

Tinct. Coccionellae, blaurot, mit NaOH unverändert, mit HCl allmählich Röthung, bei 1,4 endlich ausgesprochen hellroth; Endreaction aber nicht scharf. Unbrauchbar.

Lackmoid, violett, mit NaOH noch etwas mehr blau, mit HCl allmählich und ziemlich rasch röthlichviolett, später mehr blassviolett, mit 1,4—1,5 röthlichbraun; Endreaction ziemlich scharf, aber nicht sehr starke Farbenänderung.

Methylorange, orange mit NaOH unverändert, mit HCl bei 1,45 scharf orangeröthlich, bei 1,5 roth, 1,6 dunkelroth carmin und bleibt so. Für das Auftreten der freien Säure verwertbar!

Poirierblau C_4B blau, mit 0,2 NaOH Stich ins Violette, dann mehr und mehr violett, endlich braunroth unscharf, mit HCl unverändert blau.

Brillanterocein, carminroth, mit NaOH allmählich dunkelbraunroth, mit HCl unverändert rothorange carmin.

Tropaeolin 00 alkohol. hellgelb mit NaOH unverändert, mit HCl allmählich dunkelorange, mit ca. 1,5 rothorange und von 2,4 $\frac{1}{10}$ N.-HCl an tiefroth. Unbrauchbar.

Tropaeolin 000 wässriger Lösung. orange, mit NaOH ganz langsam und allmählich roth, mit HCl unverändert orange.

Alizarinblau, olivengrün mit NaOH allmählich dunkelgrün, mit $\frac{1}{10}$ N.-HCl von 1,4 an gelbgrün, mit 1,2 Uebergang zu schmutzig orange, dessen Farbe allmählich ohne scharfe Grenze gelborange wird. Unbrauchbar.

Alizarinroth S. tiefroth, mit 3—4 Tropfen ausgesprochen violett, mit HCl bleibt es tiefroth, aber bei 1,4 $\frac{1}{10}$ N. plötzlich gelborange und mit $\frac{1,45}{1,5}$ hellgelb. Hier beginnt freie Säure aufzutreten.

Diese Substanz ist also für das Auftreten des I. Phosphates und der freien Säure verwertbar, nicht aber für die quantitative Umwandlung in Na_3PO_4 , d. h. beim Filtriren einer saueren Lösung für das Auftreten freier Säure und beim Titiren einer alkalischen Lösung für das Auftreten des I. Phosphates verwertbar, nicht aber für die Feststellung der Punkte, wo alles Phosphat in Na_3PO_4 umgewandelt ist, resp. freie Alkalien beginnen.

Phenolphthalein, reagirt alkalisch, violettroth, mit NaOH

und sehr scharf. Verwerthbar. Siehe unten.

c) Das III. Phosphat krystallisirt mit 12 Molekülen Wasser, 5 ccm. einer einprocentigen chemisch genauen Lösung brauchten für den quantitativen Reactionsverlauf $\text{Na}_3\text{PO}_4 + \text{HCl} = \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaCl} = 1,31 \text{ ccm. } \frac{1}{10} \text{ N.-HCl.}$

Tinct. Lackmus, violett, wird dann mehr und mehr rothviolett, und um 2,6—2,7 ganz unscharf gelbröthlich.

Corallin, rothviolett, um $2,7 \frac{1}{10} \text{ N.-HCl}$ ganz unscharf gelorange.

Tinct. Coccionellae, dunkelroth violett, zwischen 2,7 und 2,8 ziemlich scharf gelbroth, dann unverändert.

Lackmoid violettblau, mit 2,8 schmutzig rothbräunlich.

Methylorange, gelborange, mit $2,7 \frac{1}{10} \text{ N.-HCl}$ ziemlich scharf roth, dann bei Mehrzusatz noch intensiver roth. Umschlag verwerthbar.

Poirierblau, violett, mit $2,4 \frac{1}{10} \text{ N.-HCl}$ unscharf blau.

Brilliantcrocein, braunroth, wird allmählich mehr rein roth ohne scharfe Grenze.

Tropaeoline. Beide ganz unbrauchbar.

Alizarinroth und Gallein, violett, mit $1,4 \frac{1}{10} \text{ N.-HCl}$ ziemlich scharf roth und zwischen 2,6 u. 2,7 scharf hellgelb.

Beide Umschläge verwerthbar für die Feststellung des Beginns der Bildung von NaH_2PO_4 und freier Säure, nicht aber für das Entstehen des II. u. III. Phosphates und freier Alkalien.

Phenolphthalein, blauroth, bei 1,3 blasser, bei $1,4 \frac{1}{10} \text{ N.-HCl}$ sehr scharf farblos. Verwerthbar.

Die Alkaliphosphate spielen in der Frage der Urinacidität die wichtigste Rolle. Für die Titration derselben ist im Vorigen das Phenolphthalein und das Alizarinroth als geeignet nachgewiesen worden; alle andern Indicatoren mussten wir ablehnen; ich kann dieselben daher auch für die nun folgenden Titrations anderer Salze ausser Acht lassen und werde mich auf die Darstellung der Verhältnisse in Bezug auf die zwei geeigneten Indicatoren beschränken, obwohl ich für mich auch für später alle angegebenen durchgeprüft habe.

Reaction einer einprocentigen chemisch genauen Lösung stark sauer.

Phenolphthalein, 5 ccm. der Lösung, mit 5,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH (entsprechend der theoretisch berechneten Menge), sehr exact blassrosa, mit 5,2 dunkler rosa und mit 5,3 intensiv roth. Dabei fällt jetzt ein weisser Niederschlag aus. Mehrere Proben ganz gleich. Gut verwerthbar für den Aciditätspunkt.

Alizarinroth. Farbe bräunlich, wie alle sauren Salze. Dabei entsteht ein feinflockiger Ausfall, der in der Lösung schwimmt. 0,2 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl. Farbe der Lösung im auffallenden Licht hellgelb.

Beginn des Auftretens freier Säuren; dafür verwerthbar. Zufügen von $\frac{1}{10}$ N.-NaOH zur Lösung. Es wird die Farbe dunkelschwärzlich, mit 0,6 etwa mehr rothbraun, zwischen 5—6 ccm. allmählich violett. Für die Bestimmung des Neutralisationspunktes aber nicht scharf genug.

Titration des secundären Calciumphosphates.

Aufschwemmung von 1,0 g in 200 aq. Chemische Berechnung der Acidität für 5 ccm. der Lösung 1,6 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl für den Reactionsverlauf $2\text{CaHPO}_4 + 2\text{HCl} = \text{CaCl}_2 + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$. Phenolphthalein, farblos neutral. 1 Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-NaOH dunkelroth, 1 Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-HCl wieder farblos. Für Neutralisationspunkt sehr gut.

Alizarinroth, schön roth. Auf HCl-Zusatz gelbbraun, nimmt aber rasch wieder roth an, wobei sich der Niederschlag mehr und mehr löst, mit 1,4—1,5 $\frac{1}{10}$ N.-HCl bräunlich-gelb, Niederschlag nur noch in Spuren, mit 1,6 chlor-gelb. Für das Auftreten freier Säuren gut.

Auf NaOH-Zusatz schon mit einem Tropfen tiefviolett.

Die Mischung der beiden Calciumphosphate ergibt wie auch die Mischung der Alkaliphosphate diejenigen Aciditäts-

werden. Desgleichen verhält es sich mit Mischungen der verschiedenen Alkaliphosphate mit den Erdalkaliphosphaten, die bei sehr zahlreichen Versuchen stets die nach obigen Einzelresultaten erwarteten Aciditätswerthe aufwiesen.

Es gelingt also die Titration aller im Urin vorkommender Phosphate für bestimmte Reactionsvorgänge mit gewissen Indicatoren, und zwar sehr genau, wie ich an Hand der chemischen Berechnung gezeigt habe.

Für die Titrirung reiner Phosphatlösungen sind daher brauchbare Indicatoren:

1. Für die Bestimmung des Neutralisationspunktes:

Phenolphthalein, sehr exact!

Alizarinroth, weniger genau. Man hat beim Auftreten der violetten Farbe bereits etwas zu viel Lauge.

Poirierblau, noch viel weniger genau. Immerhin gibt deutlich violette Färbung die Ueberschreitung des Neutralisationspunktes an.

2. Für den Zeitpunkt, wo bei Säurezusatz neben sauren Salzen freie Säure auftritt. Es finden sich jetzt nur saure Salze und die erste Spur freier Säure:

Alizarinroth, sehr gut. Die gelbe Farbe tritt scharf auf und verräth exact das Auftreten freier Säuren neben sauren Salzen.

Gallein, ebenso. (Dem Alizarinroth ist Gallein sehr nahe verwandt.)

Methylorange, es beginnt scharf Rothfärbung.

Lackmoid, ziemlich scharf röthlich-braun.

3. Für die Erkennung des Auftretens freier Basen neben nur basischen Salzen:

Kein sicherer Indicator. Die Bräunung des Poirierblau erst bei viel freiem Alkali.

Es ist hier wohl der Ort, auf die von Freund und Toepfer (l. c., pg. 315) gefundenen Ergebnisse einzugehen, die, wie ich schon früher hervorgehoben, eine ganze Reihe von Indicatoren erprobten und als geeignet empfohlen und zwar für die quantitative Bestimmung der Basen, Säuren und Salz-

des Alizarinrothes verschwinden
sauren Salze die Laugenmenge,
izarinrothes in violett verwandeln.
ach unsern Phosphattitrationen
weiten nicht recht beipflichten,
hlich erfolgt und etwas schwer

undären Salze empfehlen die
OH, um Poirierblau oder
n Alkalien zu geben; eine
e Methode, da ein scharfer
eitens schlagen sie vor,
arinrothes erscheint, ein
fahren, soweit es sich
te handelt.

ferner die Gesamt-
ns freier Säure, also
g des Alizarinrothes
phosphate als richtig
Ermittlung der Ge-
an freie Alkalien
auge bis zur Roth-
lehen.

zirt gegenüber

als in Lösung
n. $\frac{1}{10}$ N.-HCl
ht ziemlich
rstärkt die

$\frac{1}{10}$ N.-HCl
n Gallein,
weniger

aber unscharf, gibt Alizarinroth rein violette Färbung, ganz ähnlich Gallein.

Da nach der chemischen Berechnung 5,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl nöthig wäre, muss das Präparat etwas Wasser absorbirt haben.

II. Natriumcarbonat, Na_2CO_3 , reagirt stark alkalisch. 5 ccm 1%ige Lösung.

Phenolphthalein. Zugabe von $\frac{1}{10}$ N.-HCl zwischen 1,9—2,0 sehr scharf, aber in einzelnen Proben bei etwas verschiedenen Werthen, farblos. Bei vorher überschüssig zugesetzter HCl und Rücktitrirung sehr scharf 2,0.

Alizarinroth. $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure ändert das Violett um 2,0 sehr unscharf in rothviolett, bei 3,7—3,8 sehr scharf hellgelb. Gallein und Methylorange geben diese letztere Grenze ebenfalls sehr scharf, Lackmoid und Corallin etwas weniger genau an.

Nach der chemischen Berechnung ist 1,85 resp. 3,7 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl nöthig.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass einzig Phenolphthalein die frei werdende CO_2 als Säure angibt, die andern Indicatoren zeigen erst denjenigen Punkt an, wo alles NaHCO_3 und Na_2CO_3 mit HCl in NaCl, CO_2 und H_2O verwandelt ist und jetzt auch freie HCl auftritt.

In Bezug auf die Carbonate des Urins ergibt sich, dass die Titration auf den Neutralisationspunkt mittelst Phenolphthaleins gelingt und sich in Betreff des NaHCO_3 verhält wie bei Na_2HPO_4 , indem für den chemischen Ablauf der Bindung (vergl: S. 324) eine deutlich rothe Farbe verlangt werden muss.

Anders gestaltet sich aber die Ermittlung des Auftretens freier Säuren. Hierbei wird mit Alizarinroth eine freie Säure, CO_2 , unrichtiger Weise nicht berücksichtigt, während doch sonst bei der Titration von $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{HCl}$ die frei werdende H_3PO_4 sich sofort verräth und nicht erst derjenige Punkt angezeigt wird, wo neben NaCl und H_3PO_4 jetzt auch freie HCl auftritt.

Wir müssen uns demnach gegenwärtig halten,

dass wir bei der Einwirkung des Auftretens freier Säure mit Alizarinroth zu viel HCl gebraucht haben und zwar so viel zu viel, als die Kohlensäure Alkalien gebunden hat. Dieser Fehler ist aber nach aller Erfahrung als klein anzusehen.

Die Sulfate und Chloride reagiren gegenüber Phenolphthalein neutral. Zusetzen eines Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-HCl gibt keine Aenderung, dagegen von NaOH sofort alkalische Reaction.

Alizarinroth behält ihnen gegenüber die rothe Farbe; mit einer Spur HCl-Säure erscheint das Gelb der freien Säure; mit sehr wenig Alkali das Violett freier Alkalien.

Es gelingt demnach mit Titration durch HCl nicht, saure Sulfate aus neutralen herzustellen, und für den Urin geht daraus hervor, dass für die Hervorbringung der gelben Farbe des Alizarinrothes mit HCl die Chloride und neutralen Sulfate völlig indifferent sind.

Urate besitzt der normale Urin als Biurate. Eine Aufschwemmung von 0,1/200 Bikaliumurat löst sich noch nicht ganz, reagirt für Phenolphthalein neutral. Ein Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-NaOH erzeugt tiefrothe alkalische Reaction, ein Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-HCl lässt dieselbe wieder verschwinden.

Alizarinroth behält rothe Farbe bei. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH ändert dieselbe in violett. Das Auftreten freier Säure verräth sich durch sehr scharf auftretende gelbe Farbe mit 0,15 $\frac{1}{10}$ N.-HCl. Vorher ist also saures Urat gebildet worden.

Lackmoid und Methylorange geben diese Grenze ebenso an.

Die Urate erlauben also ganz gut die Bestimmung des Neutralisationspunktes mit Phenolphthalein am Harne. Saure Urate werden dabei durch NaOH in neutrales Urat verwandelt. Desgleichen geht die Bestimmung des Auftretens freier Säuren am Harn mit Alizarinroth auf Zusatz von HCl, indem

säure auftreten. Es ist hier noch daran zu erinnern, dass für die Harnacidität die Urate, wie aus ihrem Aequivalenzwerth hervorgeht, eine geringe, ziemlich zu vernachlässigende Rolle spielen.

Harnstoff ändert die Acidität des Urins nicht.

Theoretische Bedenken verursachen endlich noch die Ammoniumsalze.

Ammoniumsulfat, 5 ccm. 1%ige chemisch genaue Lösung reagirt gegenüber Phenolphthalein neutral. 0,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH rufen rothe alkalische Farbe hervor. 0,1 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl entfärben wieder völlig.

Alizarinroth, Farbe roth, neutral. Mit 1 Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-NaOH rothviolett; mit 1 Tropfen $\frac{1}{10}$ N.-HCl braungelblich, dann rasch hellgelb (freie Säure).

Aehnlich verhalten sich Methylorange, Gallein, Lackmoid, Corallin. Tinct. lign. Camp.

Ammoniumoxalat, 5 ccm. 1%ige Lösung reagirt für Phenolphthalein neutral. Zusatz von wenig $\frac{1}{10}$ N.-NaOH. Röthung für Alizarinroth neutral (Farbe schön roth).

1. Zusatz von $\frac{1}{10}$ N.-HCl. Für den Formelablauf $(\text{NH}_4)_2(\text{CO})_2 + \text{HCl} = \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4 \cdot \text{H}(\text{COO})_2$ ist nach der chemischen Berechnung 3,5 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl nöthig. Beim Titriren mit HCl erfolgt Bräunung, allmählich gelblicher Ton, und um 3,5 schwefelgelbe Farbe, die aber nicht scharf auftritt.
2. Zusatz von $\frac{1}{10}$ N.-NaOH. Es bleibt rothe Farbe, und erst um 7,0 zeigt sich violett, woraus hervorgeht, dass das NH_4 durch Na verdrängt wird und freies NaOH erst auftritt, wenn alles Salz in $\text{Na}_2(\text{COO})_2$ verwandelt ist. Das auftretende NH_4OH beeinflusst also (unrichtiger Weise!) das Alizarinroth nicht.

Für die Bestimmung des Neutralisationspunktes ist also Phenolphthalein brauchbar, für die Erzeugung des sauren Salzes und das Auftreten freier Oxalsäure Alizarinroth, dieses aber nicht besonders scharf.

Ammoniumcarbonat, 5 ccm. 1/100 Lösung. Reaction stark alkalisch. Chemische Berechnung für den Formelablauf des verwendeten Salzes $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 + \text{HCl} = \text{NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4\text{HCO}_3$ sofort sich spaltend in $\frac{\text{NH}_4\text{OH}}{\text{CO}_2}$ 4,38 ccm. $\frac{1}{10} \text{ N} \cdot \text{HCl}$.

Phenolphthalein, Titration des Salzes mit HCl. Die tiefrothe Farbe nimmt rasch ab, mit 2,0 nur noch schwach rosa, und verschwindet je nach der Schnelligkeit der Titration um 2,8—3,5. Daraus geht hervor, dass Phenolphthalein bei Anwesenheit von CO_2 auf NH_4OH schlecht reagirt, wohl aber auf die frei werdende, theils in Lösung bleibende, theils in die Luft übertretende CO_2 .

Die Titration mit diesem Indicator auf den Neutralisationspunkt gelingt also hier nicht und es versagt also die Methode, wenn der Urin Ammoniumcarbonat enthält, woraus hervorgeht, dass wir zu Aciditätsbestimmungen den Urin vor der Umwandlung des Harnstoffes in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ zu bewahren haben, was übrigens schon ohne Weiteres klar ist, als dadurch die Menge der Säuren- und Basen-äquivalente gestört würde.

Alizarinroth bewahrt bei der Titration des Ammoniumcarbonates mit HCl die rothe Farbe, verliert sie aber scharf zwischen 8,7 und 8,8. Es sind alsdann nach obiger Berechnung einem Molekül $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ zwei Moleküle HCl zugesetzt. Wir haben also auch hier wiederum die gleiche Erscheinung, dass die CO_2 gegenüber Alizarinroth nicht die Rolle einer Säure spielt, sondern dass erst die bei der Titration frei auftretende HCl die charakteristische Gelbfärbung des Alizarinrothes hervorruft.

Ueberblicken wir nochmals die Verhältnisse der Ammoniumsalze, so ergibt sich, dass die Ermittlung des Neutralisationspunktes **mittelst Phenolphthaleins** beim Titriren einer sauren Mischung vollkommen gelingt, indem das durch NaOH verdrängte NH_4OH auf den Indicator als Base einwirkt (s. Ammoniumoxalat). Wenn man also den

bestimmt, so ist die zugesetzte Alkalimenge nicht durch Verdrängung von Ammon zu gross, sondern entspricht der berechneten Grösse.

Dagegen gelingt nicht die Titration einer alkalischen Lösung, in der Ammoniumcarbonat vorhanden. Für den Urin geht daraus hervor, dass wir die Umwandlung des Harnstoffes in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ verhüten sollen. Bei dieser Voraussetzung ist aber der Urin für Phenolphthalein nie alkalisch; also fällt diese einzige Ausnahme, bei der die Titration keine richtigen Resultate ergäbe, ausser Betracht.

Andererseits reagirt Alizarinroth nicht auf NH_4OH mit genügender Schärfe, und auch die Titration von Ammoniumsalzen mit HCl auf das Auftreten freier Säure gelingt nicht exact.

Wir müssen für den Urin demnach den Schluss ziehen, dass bei der Titration des sauren Urins mit HCl zur Bestimmung des Auftretens freier Säure (Gelbfärbung des Alizarinrothes) Fehler entstehen

1. durch die Carbonate, indem Alizarinroth die Säureäquivalente der Kohlensäure nicht berücksichtigt, die verbrauchte HCl -Menge also zu gross ist;

2. durch Ammoniaksalze, indem saure Ammonsalze nicht gut auf Alizarinroth reagiren und der Umschlag unscharf ausfällt.

Da aber die Menge der Carbonate im Urin meist gering ist und der durch die Ammonsalze bedingte Fehler auch nicht erheblich ausfällt, so beträgt die Differenz nicht allzu viel.

Mischungen von verschiedenen Salzlösungen ergeben in Bezug auf Acidität meist nicht einfach eine Addition der Säurewerthe; dies geschieht nur, wenn durch die Mischung keine chemischen Reactionen erfolgen, welche die Acidität zu verändern geeignet sind; siehe Zusetzen von BaCl_2 , S. 331. — Indem nun unsere Fragestellung für den Urin dahin lautet, die Acidität der Mischung festzustellen, und diese Aufgabe richtig gelöst werden kann, so steht nichts im Wege, an die praktische Seite dieses Problems heranzutreten.

versuchen wir endlich die Titration des Urins selbst.

Man nehme ein Becherglas, füge mittelst guter Pipette 10 ccm. des (durch etwas Thymol vor Zersetzung geschützten) Tagesurins zu, gebe 3—4 Tropfen Phenolphthalein hinzu und lasse aus einer graduirten Burette $\frac{1}{10}$ N.-NaOH zufließen, unter stetem Umrühren mit dem Glasstabe, sodass die auftretende rothe Farbe immer wieder verschwindet. Allmählich dauert es länger, bis der rothe Ton weggeht, und endlich bleibt eine deutlich röthliche Nuance (am besten Vergleich mit einer anderen Urinportion in einem Becherglas!) bestehen. Es ist der Neutralisationspunkt erreicht. Die verbrauchte Menge NaOH gibt die Acidität an; sie beträgt z. B. 2,6 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-NaOH.

Wird eine 2. und 3. Urinportion in gleicher Weise titirt, so wird man fast immer genau die gleiche Zahl erhalten, und selbst wenn die Eigenfarbe trotz Verdünnung mit Aq. destill. etwas stört, ist die Differenz kaum je grösser als 0,1 bis 0,2 und kommt auch für die Tagesmenge fast nicht in Betracht.

Ich berechne jetzt den für 10 ccm. Urin erhaltenen Ueberschuss der Säureäquivalente = Acidität für die Tagesmenge 1500 ccm. um, erhalte 39 ccm. N.-NaOH = 39 ccm. N.-HCl. Ein Liter Normalsalzsäure entspricht 36,5 g Salzsäure, 39 ccm., also 1,45 g Salzsäure. Soviel beträgt also die Menge der Säureäquivalente mehr als die Menge der Basenäquivalente für den Tagesharn.

Füge ich dem Harn saures Phosphat zu, so steigt seine Acidität genau entsprechend. Desgleichen verhält sich das saure Urat und Oxalat. Setzt man neutrale Salze zu, II. Ca- und Na-Phosphat, so ändert sich die Acidität nicht.

Es kann nun für gewisse Verhältnisse werthvoll sein, auch noch die Frage zu beantworten, wie viel Säure einem Urin zugesetzt werden muss, bis freie Säure auftritt. Durch diese Titration mit HCl bewirken wir die Umlagerung der II. Phosphate, Urate, Oxalate etc. in saure Salze, die Chloride und Sulfate aber bleiben unangegriffen, die Carbonate werden ganz zerstört und ihre Alkalien an HCl gebunden. Je mehr

(Phosphate, Urate, Oxalate, Carbonate) sind vorhanden, und zur Ermittlung derselben hat sich Alizarinroth am geeignetsten erwiesen.

Die für den Harn auf diese Weise gewonnenen Resultate zeigen bei wiederholter Bestimmung des gleichen Tagesurins unter sich ebenfalls sehr exacte Uebereinstimmung. Sie zeigen uns denjenigen Theil der Phosphate, Oxalate, Urate, Carbonate an, welcher, als neutrale Salze gebunden, der gewöhnlichen Aciditätsbestimmung sich verhält. In Folge dessen entspricht die Summe des Phenolphthalein- und des Alizarinrothwerthes in Aequivalenzwerthen der Gesammtsäure der Phosphate, Urate, Oxalate, Carbonate.

Um einen Begriff von der Menge der Basen zu erhalten, die im Urin den Körper verlassen, kann man den Phenolphthaleinwerth einfach, den Alizarinrothwerth (entsprechend dem Salz Na_2HPO_4) doppelt zählen, um die Gesamtmenge der Alkalien der Phosphate, Urate, Carbonate und Oxalate zu berechnen; man bringt ihn dann am besten in Grammen reiner Natronlauge zum Ausdruck. Die Anwesenheit einer erheblichen Menge von Carbonaten würde diesen Werth unrichtiger Weise zu hoch berechnen lassen; die als Sulfate und Chloride gebundenen Basen sind dabei nicht ermittelt.

In dieser Weise vorgenommen, ergibt die Harnuntersuchung bei den verschiedenen Krankheiten bedeutende Differenzen und interessante Aufschlüsse; so erweist sich der Urin beim Diabetes nicht nur sehr reich an sauren Salzen, sondern auch an neutralen, und es gelingt, sich eine Vorstellung zu machen von der Ausfuhr und Verarmung des Körpers an Basen und von dem Nutzen der therapeutisch gegebenen Alkalien. Ich hoffe in späteren Untersuchungen darüber berichten zu können.

Kritische Untersuchungen über den Nachweis von Harnsäure und Purinbasen im Blut und in thierischen Organen.

Von

Professor W. His d. J. und cand. med. W. Hagen.

(Aus der medicinischen Klinik zu Leipzig.)

(Der Redaction zugegangen am 1. Juli 1900.)

Harnsäure und ihre Salze, in fester Form Kaninchen eingebracht, werden von Phagocyten aufgenommen. Freudweiler (Deutsches Archiv 63, S. 266) hat deren Verhalten im Unterhautzellgewebe genauer beschrieben, und in einer späteren Arbeit konnte ich zeigen (Ebenda 67, S. 81), dass die von Zellen aufgenommene Harnsäure allmählich unsichtbar wird und wahrscheinlich der Zersetzung anheimfällt. Es schien uns von grossem Interesse, das Schicksal der Säure innerhalb der Phagocyten, im Blut und den Organen genauer zu verfolgen und zu ermitteln, ob sich ein Transport in entlegene Organe oder eine Umwandlung in andere Purinkörper auf chemischem Wege erkennen liesse.

Bei diesen Untersuchungen kamen wir zur Ueberzeugung, dass die bisher angegebenen Bestimmungsmethoden mit beträchtlichen Fehlerquellen behaftet sein müssten; wir waren daher genöthigt, die Brauchbarkeit dieser Methoden systematisch zu prüfen.

Meinem Freunde Professor Siegfried bin ich für die Erlaubniss, einzelne Untersuchungen in dem von ihm geleiteten chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts auszuführen, und für manchen guten Rath herzlich dankbar, ebenso Herrn Privatdocenten Dr. Burian, der uns die Resultate seiner methodischen Untersuchungen schon vor deren Publication freundlichst mittheilte.

Ueber den quantitativen Nachweis der Purinbasen im Blute und in Organextracten existirt eine Reihe von Untersuchungen,¹⁾ die darauf hinausgehen, dasjenige Verfahren zu finden, welches die höchste Ausbeute liefert, ohne gleichzeitig andere Stoffe mit zu bestimmen. Auf Kossel's Anregung namentlich sind Bestimmungen ausgeführt worden, bei denen die gesuchten Stoffe rein dargestellt, gesondert und gewogen wurden; doch ist die Trennung der einzelnen Basen von einander schwierig, mit Verlusten verbunden und bei kleineren Mengen (s. Krüger und Salomon, Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. XXIV, S. 364, 1897 und Bd. XXVI, S. 350, 1898) überhaupt nicht ausführbar, so dass man zur indirekten Methode Zuflucht nehmen muss. Die Basen werden als Silber- oder Kupfersalz gefällt und in diesem der Stickstoff bestimmt. Dabei bleibt indessen unsicher, ob die Basen vollständig in den Niederschlag übergehen und ob nicht etwa fremde, N-haltige Stoffe mitgefällt werden, die den N-Gehalt zu hoch erscheinen lassen. Dies lässt sich entscheiden, wenn man den Organ- auszug theilt, die eine Hälfte direkt, die andere nach Zusatz einer gemessenen Menge einer Purinbase verarbeitet und sieht, ob die in der zweiten Hälfte gefundene Menge von Purin-N dem Zuwachs entspricht. Derartige Prüfungen liegen auffälliger Weise nicht vor; wir sahen uns genöthigt, dieselben systematisch vorzunehmen, und richteten unsere Aufmerksamkeit auf

1) Die wichtigsten derselben sind beschrieben von:

Kossel, Ztschr. f. physiol. Chemie V, S. 267,

„ „ „ „ „ VI, „ 422,

„ „ „ „ „ VII, „ 7,

„ „ „ „ „ VIII, „ 404;

Schindler, Ztschr. f. physiol. Chemie XIII, S. 432 (1889);

Jnoko, „ „ „ „ „ XVIII, „ 540 (1894);

Salomon, „ „ „ „ „ II, „ 65;

Bockendahl und Landwehr, Virchow's Archiv 84, S. 501.

Salkowski, Virchow's Archiv 50, S. 174, 1870.

„ „ „ „ „ 81, S. 166, 1880.

Stadthagen, „ „ „ 109, S. 320, 1887.

Burian und Schur, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 59, 1897.

„ „ „ Pflüger's Archiv, 80, S. 241, 1900.

II. die Entfernung der Eiweissstoffe und Albumosen,

III. die Fällungsmittel für die Basen.

I. Die älteren Autoren hatten die zerkleinerten Organen mit Wasser bei mässiger Temperatur (50—60 °) ausgezogen und dabei nur jenen Antheil der Purinbasen erhalten, der präformirt im Körper enthalten ist; Kossel (Ztschr. f. physiol. Chemie V, 267) zeigte zuerst, dass mehr Hypoxanthin erhalten wird, wenn die Muskeln mit verdünnter Schwefelsäure ausgekocht werden, wodurch das Nuclein und die anderen Bindungsformen der Basen zerlegt werden. Es muss indessen die Schwefelsäure durch Baryt entfernt werden, wobei Verluste möglich waren. Wir haben einige Kontrollversuche mit Wasser- und Schwefelsäureextraction an Muskeln angestellt, welche ja die Hauptmenge an Basen in präformirtem Zustand enthalten; doch sind die Resultate, aus später zu nennenden Gründen, nicht eindeutig gewesen.

II. Nach Entfernung des fällbaren Eiweisses durch Kochen und Zusatz von Essigsäure bleiben im Extract beträchtliche Mengen von Albumosen zurück. Der Einfluss derselben auf die Silberfällung der Basen ist nur unvollständig bekannt. Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. V) gab an, dass Hypoxanthin bei Gegenwart von viel Pepton oder Eiweiss durch ammoniakalische Silberlösung nicht ausgefällt wird, wohl aber bei Zusatz von Alkohol; später bemerkte er (Ebenda, Bd. VIII), dass Peptone das Ausfällen der Basen nicht hindern und deren Entfernung durch Bleiessig nicht nothwendig sei.

Salkowski, Salomon, Landwehr und Bockendahl fällten die Albumosen aus dem eingedampften Extract durch das doppelte Volumen 95%igen Alkohols, doch ist diese Fällung, wovon man sich leicht überzeugen kann, eine unvollständige. Stadthagen befreite den schwefelsauren Auszug mit Baryt von Schwefelsäure, mit kohlensaurem Lithion vom überschüssigen Baryt. Die Flüssigkeit durfte mit Ferrocyankali keinen Niederschlag geben; andernfalls wurde sie mit Pepsin verdaut; die Albumosen hat Stadthagen nicht weiter entfernt. Burian und Schur haben bei ihren ausgedehnten Unter-

zur Extraction der verdünnten Schwefelsäure, entfernten dieselbe mit Baryt und fanden, dass der Barytniederschlag sämtliches Acidalbuminat und einen Theil der Albumosen einschliesst. Ein anderer Theil der letzteren geht ins Filtrat über und hindert, wie schon Drechsel und Salomon angegeben, die vollständige Fällung der Basen. Diese erste, aus albumosehaltiger Lösung gefällte Basenmenge wurde als «Hauptfällung» bezeichnet, das Filtrat derselben mit basischem Bleiacetat von Albumosen befreit und nochmals mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, welche nun eine zweite, kleinere Basenmenge liefert (Correctur). Die Summe beider Werthe wurde als «corrigirter Werth» bezeichnet.

Ein anderes Vorgehen bestand darin, dass der neutralisirte Organextract gleich Anfangs mit basischem Bleiacetat ausgefällt und das entbleite Filtrat mit Silber gefällt wurde. Die nach letzterem Verfahren gewonnenen Werthe waren um 10—12 % niedriger, als die «corrigirten» Werthe.

Endlich fällten Burian und Schur den Organextract nach Krüger-Wulff (wodurch mehr N ausfällt, als durch Silberlösung), zerlegten den Niederschlag und fällten, nach Entfernung des Kupfers, mit Silber. Diese Werthe waren am niedrigsten; obwohl also Kupfersulfat und Natriumbisulfid im Ganzen mehr N fällten, war die Xanthinbasenfällung am unvollkommensten.

In ihrer letzten Arbeit (Pflüger's Archiv, 80) besprechen Burian und Schur diese Methoden nochmals (S. 306 ff.); sie geben zu, dass die «Hauptfällung» ihrer ersten Methode wegen des Albumosengehaltes zu hohe, die zweite Methode, wegen des Uebergangs von Albumosen in den Bleiniederschlag, zu niedrige Werthe liefern müsste, und dass der wahre Werth in der Mitte liege; doch waren die Differenzen so gering, dass sie für ihre Ueberlegungen nicht ins Gewicht fielen.

III. Ueber den Unterschied der Silber- und Kupferfällung an Basen wurde soeben das Ergebniss von Burian und Schur besprochen; wir verweisen auf unsere unten mitgetheilten Versuche (S. 376).

Eigene Untersuchungen.

Aus unseren zahlreichen Versuchen, die Purinbasen in Kaninchenorganen zu bestimmen, seien hier nur einige wenige als Belege für die Fehlergrösse der benützten Methoden angeführt.

Versuch I (Nr. XVIII unserer Protokolle), angestellt, um den Unterschied der Extraction mit Wasser und mit Schwefelsäure, sowie den Einfluss der Entfernung der Albumosen mit Alkohol (nach Salkowski) auf die Menge der Silberfällung zu zeigen.

Ein Kaninchen, dem Harnsäure subcutan injicirt war, wurde nach 12 Tagen getödtet, Muskeln und Organe zusammen in der Fleischhackmaschine zerkleinert, sorgfältig gemischt; die ganze Masse (1242 g) in 4 gleiche Theile getheilt; 2 Portionen mit Wasser bei 50—60° 12 Stunden digerirt, der Rückstand ausgepresst und noch zweimal mit warmem Wasser ausgezogen; die Filtrate vereinigt («Wasserauszug»). Die 2 anderen Portionen wurden mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprocent ausgezogen, mit Baryt und Lithioncarbonat nach Stadthagen behandelt. Von jeder der 4 Portionen wurde ein Drittel direkt mit ammoniakalischem Silber ausgefällt und in dem gewaschenen Niederschlag der N-Gehalt bestimmt. Die anderen zwei Drittel wurden mit 4 Volumen absoluten Alkohols versetzt, vom Peptonniederschlag abfiltrirt, aus dem Filtrat der Alkohol verjagt, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen, nach dem Erkalten mit Ammoniak versetzt und dann mit salpetersaurem Silber gefällt, der gewaschene Silberniederschlag nach Kjeldahl behandelt. Auf die Gesamtmenge (1242 g) berechnet wurden gefunden

im Wassereextract, bei direkter Fällung	0,1118 N
nach Alkoholbehandlung	1. 0,3089
	2. 0,4687
im Schwefelsäureauszug, bei direkter Fällung	1. 0,3770
	2. 0,4152
nach Alkoholbehandlung	1. 0,2592
	2. 0,3402

Versuch II (Nr. XIX unserer Protokolle). Untersuchung der wässerigen und schwefelsauren Auszüge, unter Zusatz von Guanin.

Beschreibung s. unten) wurde mit wenig HCl in Lösung gebracht und in dieser Lösung sowohl durch direkte Analyse, als durch Analyse der Silbersalze der N-Gehalt bestimmt. Er betrug in 100 ccm. 0,0861 g. Die Muskeln und Organe eines Kaninchens, zusammen 1252 g, wurden in 4 gleiche Theile getheilt, davon

Portion I mit siedendem Wasser zur Erschöpfung extrahirt,

- › II mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprocent ausgezogen,
- › III nach Zusatz einer gemessenen Menge Guaninlösung mit kochendem Wasser extrahirt,
- › IV nach Zusatz von Guanin mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprocent kochend extrahirt.

Die wässerigen Auszüge wurden durch Kochen und Essigsäure vom Eiweiss befreit und gemessene Theile derselben theils direkt, theils nach Vorbehandlung mit 4 Volumen absoluten Alkohols der Silberfällung unterworfen. Ebenso wurde mit den Schwefelsäureauszügen verfahren. Die nachstehenden Werthe sind je auf $\frac{1}{4}$ der gesammten Muskel- und Organmenge (313 g) berechnet.

I. Wasserauszug, a) direkt gefällt	a) 0,0270
b) nach Alkoholbehandlung	b) 0,0302
II. Schwefelsaurer Auszug a) direkt gefällt	a) 1. 0,0221
	2. 0,0272
b) nach Alkoholbehandlung b)	0,0151
III. a) Wasserauszug nach Zusatz von Guanin direkt gefällt	
N-Gehalt der Organbasen, nach I a)	0,0270
› des Guanins	0,0107
für beide berechnet	0,0377
gefunden	0,0291
Verlust	0,0086
b) nach Alkoholbehandlung gefällt.	
N-Gehalt der Organe, nach I b)	0,0302
› des Guanins	0,0107
für beide berechnet	0,0409
gefunden	0,0222
Verlust	0,0187

ng

nach III b)	0,0151
	<u>0,0107</u>
	0,0258
	<u>1. 0,0192</u>
Verlust	0,0066
	<u>2. 0,0204</u>
Verlust	0,0054

ten statt vieler zeigen, dass
nenen Werthe von einander
Gesetzmässigkeit dieser Ab-
Die Fällung nach vor-
höhere, bald niedrigere
der Schwefelsäureauszug
ekstoff, als der Wasser-
ässig behandelt waren
nge, in der die Silber-
uben ganz verschiedene
s das dem Organbrei
n Verlusten wieder-

r gleiches Material
senstickstoff stark
ganze Menge des
eine Theilmengen

berfällung über-
rübung eintrat,
ässigkeit unter
Auch Zusatz
häufig un-

rs reichlich
essigsaures
bei tage-
leichterte

Basen nieder.

Wir sehen uns daher genöthigt, den Einfluss der fällungshindernden Stoffe, vor allem der Albumosen, eingehend zu untersuchen.

Versuche über Fällung von Guanin in albumosehaltigen Lösungen.

Zu diesen Versuchen verwendeten wir ein von Georg Grübler in Leipzig bezogenes Guaninpräparat, welches nur 85 % des geforderten Stickstoffs, ziemlich viel Kalk, daneben auch noch andere Basen enthielt, welche die Xanthin-Murexidprobe gaben. Diese Verunreinigungen schadeten im vorliegenden Falle nicht, da die Menge des durch Silber fällbaren Basenstickstoffs bei jeder frisch bereiteten Lösung nach Kjeldahl besonders bestimmt wurde.

Als Albumosengemenge benutzten wir das Witte'sche Pepton. Dasselbe enthält nach E. Pick (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 346) wenigstens 5 verschiedene Albumosen, 2 Peptone und ausserdem etwas Eiweiss, das durch Neutralisiren und Kochen der Lösung ausgefällt werden kann. Alle von mir verwendeten Lösungen sind von diesem Eiweissantheil befreit. Ich zog das Wittepepton zu unsern Versuchen einer reinen Albumose vor, weil es als Albumosengemenge die Verhältnisse bei thierischen Organauszügen am besten nachahmt.

Versuch III (Nr. XX unseres Protokolls): Lösung von Wittepepton 1:15, Lösung von salzsaurem Guanin, wovon 10 ccm. 5,6 mg N enthält; ausgefällt mit 10 ccm. n/5 Silbernitrat, 20 ccm. 10 % Ammoniak.

1. 50 ccm. Peptonlösung, 10 ccm. Guaninlösung, Gesamtvolumen nach Zusatz von Silberlösung und von Ammoniak 90 ccm., Peptongehalt ca. 3,7 %: leichte Trübung, nach 12 Stunden noch kein flockiger Niederschlag;

2. 50 ccm. Peptonlösung, 10 ccm. Guaninlösung, 250 ccm. Wasser, Gesamtvolumen 340 ccm., Peptongehalt ca. 1 %: die Lösung bleibt völlig klar. Zusatz von weiteren 10 ccm. Silberlösung erzeugt keinen Niederschlag, all-

10 ccm. Wasser, 10 ccm. Guanin-
c c m., Peptongehalt 0,54 %:
setzt aber keinen Niederschlag
ab aus Silberlösung.

1/2 % ist also schon im
s zu verhindern.

in niedrigerer Gehalt die
h zum Theil verhindern
Stickstoffgehalt des
ags. Dabei ergab sich
sche Silberlösung ein
dem Guanin gefällt
s zu gross gefunden

ist befreit ist, gibt an
1 Niederschlag.

onlösung 1 : 20, vom
Essigsäure befreit;
mg N enthielten;
sung und 25 ccm.
olumen der Flüs-

t.

35 %

1/2

wird durch
2 Stunden

übt sich
Stunden

1:20; zu jedem Versuch 10 ccm. Guaninlösung, enthaltend 4,84 mg N; zur Fällung 10 ccm. n/5 Lösung von Arg. nitr., 25 ccm. Ammoniak, spec. Gewicht 0,950; Gesamtvolumen auf 150 ccm. gebracht.

1. 0,1 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0033%
 berechnet 4,84 mg N
 gefunden 4,98 „
 N zuviel 0,14 mg = 2,89%
2. 0,2 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0066%
 N zuviel 0,73 mg. = 15,03%
3. 0,3 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0099%
 N zuviel 1,04 mg = 21,47%
4. 0,4 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,013%
 N zuviel 1,39 mg = 28,78%
5. 0,5 ccm. Peptonlösung, Peptongehalt 0,0165%
 N zuviel 1,39 mg = 28,78%

Versuch VI (XXIV): Einfluss der Verdünnung auf die Fällung des Guanins in Albumoselösungen.

10 ccm. einer Guaninlösung, enthaltend 3,71 mg N mit 5 ccm. einer 1%igen Lösung von Pepton; das Gesamtvolumen auf 100, 300 und 1000 ccm. gebracht; zur Fällung je 10 ccm. n/5 Silbernitratlösung und 25 ccm. Ammoniak, 0,950 spec. Gewicht.

1. Gesamtvolumen 100 ccm., Peptongehalt 0,033%. Beim Zusatz von Silber erscheint der Niederschlag sofort als bläuliche Trübung und setzt bald gut ab.

N-Gehalt berechnet 3,71 mg
 gefunden 5,66 „
 zuviel 1,95 mg = 51,52%

2. Gesamtvolumen 300 ccm., Peptongehalt 0,0143%. Auf Zusatz des Silbers schwach bläuliche Trübung; nach 12 Stunden Niederschlag gut abgesetzt.

N berechnet 3,71 mg
 gefunden 5,72 „
 zuviel 2,01 mg = 54,02%

3. Gesamtvolumen 1000 ccm., Peptongehalt 0,0047%. Auf Zusatz der Silberlösung blieb die Flüssigkeit zunächst klar,

Niederschlag abgesetzt.

4. Versuch wie unter II, aber mit 25 ccm. Guaninlösung, entsprechend 9,29 mg. N, Gesamtvolumen 300 ccm., Peptongehalt 0,0137%. Auf Silberzusatz sofort flockige Fällung, die alsbald zu Boden sinkt.

N berechnet	9,29 mg
gefunden	<u>9,80</u> "
zuviel	0,51 mg = 5,49 %

Denselben Einfluss des Gesamtvolumens auf die Fällbarkeit des Guanins zeigt

Versuch VII (XXXI): 5 ccm. Guaninlösung, mit 1,86 mg N, mit 5 ccm. 1%iger Peptonlösung.

Gesamtvolumen 20 ccm.: flockige Fällung, nach 3 Stunden klar abgesetzt

40	} Trübung, nach 3 Tagen nicht abgesetzt
60	
100	

Uebersichtstabelle.

Peptongehalt	N-Ueberschuss
0,0033 %	2,89 %
0,0066 "	15,03 "
0,0099 "	21,47 "
0,0139 "	20,78 "
0,0165 "	28,78 "
0,0185 "	27,1 "
0,037 "	35,0 "
0,074 "	Niederschlag setzt nicht ab
0,033 "	51,52 %
0,014 "	54,02 "
0,047 "	Niederschlag setzt nicht ab
0,137 "	5,49 %

Ergebnisse:

1. Sind Albumosen in einer Guaninlösung vorhanden, so gehen sie entweder in den Silberniederschlag zum Theil über oder sie verhindern dessen Entstehung. Ersteres ist bei geringem, letzteres bei höherem Albumosengehalte der Fall.

2. Die Menge der in den Silberniederschlag übergehenden

Albumosen und ihrem Verhältniss zum Guaningehalt. Schon ein sehr geringer Albumosengehalt (0,006%) der Lösung bedingt beträchtliche Fehler (15%), wenn in dem Silberniederschlag der N-Gehalt bestimmt wird.

3. Schon in geringer Menge (0,05%) können die Albumosen die Entstehung des Silberniederschlags verhindern. Ob ein Niederschlag entsteht oder nicht, hängt ab:

- 1. bei gleicher Basenmenge von dem procentualen Gehalt an Albumosen;*
- 2. bei gleicher Basen- und Albumosenmenge von dem Volumen der auszufällenden Flüssigkeit;*
- 3. bei gleichem Volumen und Albumosengehalt von der Menge der vorhandenen Base.*

Einfluss des Salzgehaltes auf die Ausfällung der Basen in albumosenhaltigen Lösungen.

Versuch VIII. 5 ccm. Guaninlösung, enthaltend 3,43 mg N, mit 5 ccm. 2%iger Peptonlösung versetzt und mit der (ausreichenden) Menge von 5 ccm. $\frac{n}{5}$ Silbernitratlösung und ebensoviel Ammoniak ausgefällt.

1. Gesamtvolumen 20 ccm.: dichte Trübung, nach 12 Stunden kein Niederschlag;
2. a) Gesamtvolumen 50 ccm.: sofort schwache Opaleszenz, nach 12 Stunden kein Niederschlag;
b) dieselbe Lösung, mit 1,0 g Ammonsulfat: sofort flockige Fällung; nach 12 Stunden gut abgesetzt;
3. a) Gesamtvolumen 100 ccm.: sofort schwache Opaleszenz, nach 12 Stunden fast klar;
b) dieselbe Lösung, mit 2,0 g Ammonsulfat: sofort flockige Fällung, nach 12 Stunden Niederschlag gut abgesetzt;
4. a) Gesamtvolumen 200 ccm.: ist nach 12 Stunden noch wasserklar;
b) dieselbe Lösung, mit 5,0 g Ammonsulfat: sofort dichte, nicht flockige Fällung; nach 12 Stunden flockiger Niederschlag;

Ammonsulfat: gibt mit Ammoniak
Niederschlag, auch nach 12 Stunden

gesättigten Lösung von Ammon-
ium, Ammoniak und Silberlösung
Fällung. Nach 12 Stunden
und nach Kjeldahl bestimmt:

. 6,86 mg

. 7,05 "

0,19 mg, wahrscheinlich im
Ammoniak.

Wasser gelöst, Ammoniak
hydroxyd im Ueberschuss
zu 5 ccm. Guaninlösung
nach 12 Stunden ist kein

10 ccm. Wasser gelöst,
5 ccm. Silberlösung
zur Reaction zugefügt.
führen zunächst ver-
Niederschlag am Boden
ammonfrei gewaschen

Ammoniak.

in albumose-
fat begünstigt.
at kann der
Silber be-

essigsäure.
ung nicht

Versuch IX (XXIV): 0,1 g Pepton Witte und 0,04 g Guanin (reines Präparat, von Drechsel hergestellt) wurden in Wasser und etwas Salzsäure gelöst, mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und Ammoniak im Ueberschuss zugefügt. Der entstandene Silberniederschlag wurde decantirt, bis das Waschwasser, auch beim Einengen bis auf 2 ccm., keine Biuretreaction mehr gab. Der Niederschlag wurde mit Schwefelammon zersetzt, aus dem Filtrat mit Essigsäure und Erwärmen der Schwefelwasserstoff entfernt: die Flüssigkeit gibt starke Biuretreaction.

Ebenso, wenn statt mit Silbernitrat mit einer Lösung von Chlorsilber in Ammoniak gefällt wurde. Obige Flüssigkeit, welche neben dem Guanin noch Albumosen enthielt, wurde nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt, der Niederschlag wie oben mit Schwefelammon zersetzt; die Flüssigkeit gab nun, nach Verjagen des SH_2 , keine Biuretreaction mehr.

Aus einem mit verdünnter Schwefelsäure extrahirten Kaninchenmuskel war durch Fällung mit ammoniakalischem Silber und Zerlegung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff eine bräunliche Masse erhalten worden. Dieselbe gab, mit einem Tropfen HCl und etwas Wasser gelöst, starke Biuretreaction. Ein Theil der Lösung wurde nochmals mit Silber gefällt (wobei der Niederschlag sich schlecht absetzte und das Filtrat trüb blieb), der Niederschlag albumosetfrei gewaschen, dann mit Schwefelammon zersetzt. Die vom SH_2 befreite Flüssigkeit gab noch deutliche Biuretreaction. Erst nachdem die Silberfällung nochmals wiederholt war, blieb die Biuretreaction in dem zersetzten Niederschlag aus.

Ergebnisse:

6. *Der in albumosehaltigen Lösungen erzeugte Silberniederschlag des Guanins enthält Albumosen eingeschlossen. Dieselben können durch Zerlegen des Niederschlags und abermaliges Füllen mit Silber entfernt werden.*

*bumosen, bei höherem Albumosen-
tellen (im Ganzen also 4malige
die Reste der Albumosen zu ent-*

nd schwankenden Werthe ver-
timmungen in Organextracten
an Albumosen und Basen
niedrig ausfallen, und selbst
sobald nur die Flüssigkeits-
en wurde, verschieden war.
ehen, schienen zwei Wege

, falls er unvollkommen
at erleichtert und ver-
demselben durch mehr-
annten die Albumosen

die leicht mit Ver-
inn. Medicin, 1897,
ss, um den Silber-
denlang Schwefel-
Salkowski und
75) haben diese

henden Flüssig-
häufig colloid
Neutralisiren
hier Verluste
Der Silber-
bracht, an
asser fein
dann zum
zugefügt,
stoff ent-
chwefel-
as erst

die im Centrum der Klümpchen zurückbleibenden, durch den Ueberzug von Schwefelsilber geschützten unzersetzten Massen. In einen Kontrollversuch gab eine Guaninlösung, die 9,32 mg N enthielt, nach einmaligem Umfällen 4,55 mg, nach zweimaligem Umfällen nur noch 3,43 mg N.

Schliesslich ist uns auch begegnet, dass sehr albumosereiche Extracte, die direkt mit Silber keine Fällung lieferten, auch nach Zusatz von Ammonsulfat keinen reinlichen Niederschlag lieferten.

Aus all diesen Gründen bemühten wir uns, Methoden zu finden, durch welche die Albumosen vor der Silberfällung ohne Basenverlust weggeschafft werden konnten.

Versuche über Enttarnung der Albumosen vor der Silberlösung.

I. Ammonsulfat und Eisenalaun.

Versuch X. 1. 0,2 g Pepton Witte, 0,04 g Guanin, mit 200 ccm. halbgesättigter Ammonsulfatlösung: nach 3 Tagen kein Niederschlag;

2) derselbe Versuch; der Lösung wird Eisenammoniakalaun zugefügt. Es entsteht ein brauner Niederschlag. Der Niederschlag gewaschen, durch Ammoniak zersetzt, vom Eisenoxydhydrat abfiltrirt; das Filtrat gibt starke Biuretreaction; mit Silberlösung keinen Niederschlag.

Das Filtrat, nach Entfernung der Schwefelsäure durch Baryt, des Baryts durch CO_2 eingedampft; Rückstand in wenig Wasser aufgenommen: gibt keine Biuretreaction mehr, aber nur ganz schwache Silberfällung.

Es müssen demnach Basen in den Eisenniederschlag übergegangen, aber ihre Silberfällung bei dessen Zersetzung durch die Albumosen verhindert worden sein.

Versuch XI (XXX): Eine Guaninlösung, 5,57 mg N enthaltend, wurde mit 10 ccm. 2%iger Peptonlösung versetzt, mit Wasser auf 250 ccm. aufgefüllt; dazu 250 ccm. einer kaltgesättigten Ammonsulfatlösung und 20 ccm. gesättigter Eisenammonialaunlösung gefügt. Der braune Niederschlag in warmer Salzsäure gelöst, das Eisen durch Ammoniak ausgefällt, das Filtrat neutralisirt, zur Entfernung der Albumosen

mit Ammonsulfat gesättigt, mit Ammoniak und Silberlösung versetzt: kein Niederschlag. Es schienen also im Eisenpeptonniederschlag keine Basen vorhanden zu sein.

Das Filtrat der Eisenpeptonfällung, von Schwefelsäure und Baryt befreit, mit Ammoniak und Silber gefällt; es entstand eine schwache Fällung, die aber nur 2,1 statt der gesuchten 5,57 g N enthielt. Somit waren Basen verloren gegangen.

II. Entfernung der Albumosen durch Zinksulfat.

Zinksulfat ist nach Zuntz (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 219) ein gutes Fällungsmittel für die Albumosen des Wittepeptons. Eine Guaninlösung, mit Zinksulfat und soviel Ammoniak versetzt, dass das ausgefallene Zinkhydroxyd wieder völlig gelöst wird, gibt mit Silbernitrat einen Niederschlag von Guaninsilber.

Ist jedoch in der Lösung gleichzeitig Pepton vorhanden, so bleibt, wie wir oben sahen, die Fällung aus.

Es muss somit, nach Entfernung der Albumosen durch Zinksulfat, das Zink vor der Silberfällung entfernt werden.

Versuch XII (XXXIV C): Guanin, entsprechend 6,86 mg N, mit 0,2 g Wittepepton in 100 ccm. Wasser gelöst, mit Schwefelsäure leicht angesäuert, mit Zinksulfat gesättigt, von den ausgefallenen Albumosen abfiltrirt.

1. Direkte Fällung mit Silbernitrat: kein Niederschlag;
2. Zink durch hinreichende Menge Ammoniak als Hydroxyd gefällt, dem Filtrat Silbernitrat zugefügt: kein Niederschlag;
3. Zink durch Schwefelwasserstoff entfernt, dieser im Filtrat durch Essigsäure und Kochen verjagt, dann mit Ammonsilber gefällt, der gewaschene Niederschlag nach Kjeldahl behandelt:

berechnet	6,86 mg
gefunden	6,9

also ein geringer, von Ammoniakresten herrührender Ueberschuss an N.

III. Entfernung der Albumosen durch Trichloressigsäure.

Trichloressigsäure (S. Fränkel) ist ein gutes Fällungsmittel für Eiweisskörper; Albumosen fällt es nicht vollständig;

Zerlegung durch die Biuretprobe nachgewiesen wurden, und muss umgefällt werden, sonst bekommt man zu hohe Stickstoffwerthe.

Mit Trichloressigsäure allein gibt Guanin keine Fällung.

Versuch XIII (XXXV 8): 5 ccm. Guaninlösung, enthaltend 3,43 mg N, mit 0,1 g Wittepepton, 100 ccm. Wasser und 10,0 g Trichloressigsäure. Nach einigem Stehen vom Albumosen-niederschlag abfiltrirt, Filtrat ammoniakalisch gemacht, mit Silber gefällt und direkt der Stickstoff bestimmt:

berechnet 3,43 mg

gefunden 4,44 »

also ein Ueberschuss von 1,00 mg, vom Albumosen-N herrührend.

(XXXIV B.) Guaninlösung 6,86 mg N enthaltend, mit 0,05 g Wittepepton in 100 ccm. Wasser gelöst, 10 g Trichloressigsäure zugefügt; das Filtrat, nach Uebersättigen mit Ammoniak, durch Silbernitrat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelammon zersetzt und nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt:

berechnet 6,86 mg N

gefunden 1. 5,67 » »

» 2. 6,30 » »

IV. Entfernung der Albumosen durch Ammonsulfat.

A. Unvollständige Albumosenfällung.

Versuch XIV (XXXIV D): 1. Guaninlösung, entsprechend 6,86 mg N, mit 0,02 g Pepton Witte in 100 ccm. Wasser gelöst, 1 g Ammonsulfat zugesetzt, filtrirt, das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt, der Niederschlag 3 Mal umgefällt:

berechnet 6,86 mg N,

gefunden 1. 4,69 » »

2. 5,28 » »

2. Guaninlösung, entsprechend 6,37 mg N, mit 2,0 g Pepton Witte in 100 ccm. Wasser gelöst, mit ammoniakalischem Silber versetzt. Erst bei Zusatz von 20 g Ammonsulfat entsteht ein Niederschlag. Dieser wird gesammelt, 3 Mal umgefällt (nach der ersten Zersetzung mit Schwefelammon entsteht ein Nieder-

Schlag mit ammoniakalischem Silber erst nach Zuzug von
1 g Ammonsulfat):

berechnet 6,37 mg N,
gefunden 5,28 „

B. Vollständige Albumosenfällung.

3. Guaninlösung, enthaltend 6,86 mg N, mit 0,2 g Pepton Witte in 60 g Wasser gelegt, 1 ccm. 25%ige Schwefelsäure zugefügt (Pick l. cit.); krystallisiertes Ammonsulfat bis zur Sättigung eingetragen, nach einigen Stunden von den Albumosen abfiltrirt, das Filter mit angesäuerter, concentrirter Ammonsulfatlösung nachgewaschen; das Filtrat mit Ammoniak und Silbernitrat gefällt, im gewaschenen Silberniederschlag der Stickstoff ohne Umfällen bestimmt:

berechnet 6,86 mg N,
gefunden 6,12 „
Verlust . . . 0,74 mg N.

Versuch XV (XXXVI): Guaninlösung, 9,32 mg N enthaltend, wurde mit verschiedenen grösseren Mengen Wittepepton in 100 ccm. Wasser gelöst, 2 ccm. 25%ige Schwefelsäure zugefügt, die Lösung kalt mit Ammonsulfat gesättigt, filtrirt, der Albumosenniederschlag nochmals in etwas Wasser gelöst, und wieder mit Ammonsulfat gesättigt; die Filtrate vereinigt, mit Ammoniak versetzt und mit Silberlösung gefällt, und da nicht völlig albumosenfrei, einmal mit Schwefelammon zersetzt und nochmals mit ammoniakalischem Silber gefällt:

	verlangt 9,32 mg N,	
Peptongehalt 5 %,	gefunden 7,19 „	Verlust 2,13 mg,
„ 10 %,	„ 8,12 „	„ 1,20 „
„ 25 %,	„ 7,19 „	„ 2,13 „

Versuch XVI (XLII): Peptongehalt 5 %, Guaninmenge wechselnd, Behandlung wie oben:

verlangt 9,32 mg,	gefunden 5,22 mg,	Verlust 4,1 mg,
„ 27,96 „	„ 22,48 „	„ 5,48 „

Versuch XVII (XLIV): Peptongehalt 5 %; wechselnde Menge von Guanin. Die Lösung zum Sieden erhitzt, kochend mit Ammonsulfat gesättigt, zwei Tage auf Eis gestellt, dann filtrirt. Der Rückstand, Pepton und krystallinisches Ammon-

Ammonsulfat gesättigt, nach 24 Stunden filtrirt. Die vereinigten Filtrate mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt:

verlangt	18,66 mg N,	gefunden	16,24 mg	Verlust	2,42 mg
"	27,97 " "	"	24,42 "	"	3,55 "
"	27,97 " "	"	24,81 "	"	3,16 "

Thatsächlich sind die Verluste aber noch grösser, denn die Ausfällung der Albumosen durch Ammonsulfat im Sieden ist unvollständig und der Silberniederschlag durch SH_2 zer-
setzt, das Filtrat stark eingeeengt, gibt schwache, aber deut-
liche Biuretreaction.

Werden dagegen die Albumosen in der Kälte durch Sättigen mit Ammonsulfat und Zusatz von 2 ccm. 25%iger Schwefelsäure auf 100 ccm. Flüssigkeit ausgefällt, so ist die Fällung eine vollständige, und es gehen, wie mehrere Kontroll-
versuche zeigten, keine Albumosen mehr in den Silbernieder-
schlag über. Die Verluste im Versuch XVI rühren daher, dass in concentrirter Lösung von Ammonsulfat die Silberver-
bindung des Guanins nicht vollständig ausfällt.

Versuch XVIII (XLVII): Guanin in concentrirter Ammon-
sulfatlösung, mit ammoniakalischem Silber gefällt:

verlangt	13,99 mg N,	gefunden	11,79 mg,	Verlust	2,20 mg,
		"	11,85 "	"	2,14 "

Versuch XIX (L): Ebenso, Ammonsulfatlösungen mit
wechselnder Concentration:

gesättigte Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15,92 mg,	gefunden	14,42 mg,	Verlust	1,50 mg,
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

50%ige Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15,92 mg,	gefunden	15,12 mg,	Verlust	0,80 mg,
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

25%ige Lösung von Ammonsulfat

verlangt	15,92 mg,	gefunden	15,54 mg,	Verlust	0,38 mg.
----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

Die Ammonsulfatlösung muss also vor der Silberfällung
mit ca. 3—4 Theilen Wasser verdünnt werden.

Versuch XX (XLIII): Guaninlösung, in 100 ccm. 5%iger
Peptonlösung, mit 2 ccm. 25%iger Schwefelsäure angesäuert,
in der Kälte mit Ammonsulfat gesättigt, nach 24 Stunden
filtrirt, der Filtrerrückstand in wenig heissem Wasser ge-
löst, nochmals mit Ammonsulfat behandelt; die vereinigten

Filtrate mit Wasser verdünnt und ammoniakalischem Silber gefällt:

verlangt 18,65 mg N,	gefunden 18,00 mg,	Verlust 0,65 mg,
27,97 > >	26,35 >	1,62 >

Uebersichtstabelle.

Bestimmung von Guanin in albumosenhaltigen Lösungen.

Methode.	Berechnet mg I	Gefunden mg I	Mittel mg I
I. Silberfällung in albumosenhaltiger Lösung:			
in gesättigter Ammonsulfatlösung.....	6,86	7,05	+ 0,19
in 10%iger Lösung von Trichloressigsäure	3,43	4,44	+ 1,01
II. Silberfällung nach vorheriger Entfernung der Albumosen:			
A. durch Ammonsulfat und Eisenaalum.....	5,37	2,1	— 3,2
B. durch Zinksulfat:			
in der Zinksulfatlösung gefällt	6,86	—	— 6,86
Zink durch SH ₂ entfernt.....	6,86	6,91	+ 0,05
C. durch Trichloressigsäure:			
Silberniederschlag, direkte Bestimmung	3,43	4,44	+ 1,01
1 mal umgefällt.....	6,86	6,30	— 0,56
D. durch Ammonsulfat:			
Albumosengehalt 0,33%	6,86	6,12	— 0,74
> 5%, Ag-Niederschlag 1 mal umgefällt ..	9,32	7,19	— 2,13
> 10%, > > > ..	9,32	8,12	— 1,20
> 25%, > > > ..	9,32	7,19	— 2,13
> 5%, von d. Albumosen sofort abfiltrirt ..	9,32	5,22	— 4,10
> 5%, > > > ..	27,96	22,48	— 5,48
> 5%, nach 24 Stunden filtrirt.....	18,66	18,00	— 0,65
> 5%, > > > ..	27,97	26,35	— 1,62
> 5%, Albumosen im Sieden ausgesalzen ..	18,66	16,24	— 2,42
> 5%, > > > ..	27,97	24,42	— 3,55
> 5%, > > > ..	27,97	24,81	— 3,16

8. *Durch Zusatz von Ammonsulfat oder Trichloressigsäure gelingt es, in albumosenreichen Lösungen einen Silberniederschlag zu erzielen. Derselbe enthält indessen Albumosen.*

9. *Die Entfernung der Albumosen vor der Silberfällung geschieht:*

durch Ammonsulfat und Eisenalaun, unter starkem Verlust von Basen;

durch Trichloressigsäure unvollkommen, so dass der Silberniederschlag Albumosen einschliesst;

durch Zinksulfat vollständig, doch muss das Zink vor der Silberfällung durch Schwefelwasserstoff völlig entfernt werden, da es die Fällung der Basen hindert;

durch Ammonsulfat in leicht schwefelsaurer Lösung vollständig, falls der Albumosenniederschlag durch Sättigung in der Kälte erzeugt wird und 24 Stunden steht. In diesem Falle ist der Silberniederschlag frei von Albumosen und braucht nicht umgefällt zu werden.

10. *In concentrirter Lösung von Ammonsulfat ist die Silberfällung verzögert und unvollständig, in 25%iger Lösung dagegen vollständig. Es muss daher die von den Albumosen abfiltrirte Lösung vor der Silberfällung entsprechend mit Wasser verdünnt werden.*

Neben der «Ammonsulfatmethode» haben wir noch eine zweite versucht, bei der die Albumosen durch basisches Bleiacetat vor der Silberfällung niedergeschlagen wurden. Nun geht, wie schon Städeler (Ann. der Chemie u. Pharmacie, 116, S. 105), Krüger und Salomon (Zeitschr. f. physiol. Chemie, XXIV, S. 364 ff.) und Burian und Schur (Pflüger's Archiv, 81) beobachtet hatten, ein Theil der Basen in den Bleiniederschlag über. Burian und Schur haben diesen Antheil vernachlässigt; wir hielten es aber doch für nöthig, denselben zu bestimmen, und zerlegten daher den Bleiniederschlag durch Schwefelwasserstoff, befreiten das Filtrat durch Ansäuern und Erwärmen von demselben und fällten mit am-

moniakalischer Silberlösung («Correctur»). Ebenso wurde das Filtrat vom Bleiniederschlag behandelt; beide Werthe mussten vereinigt die Menge des Basenstickstoffs repräsentiren. Die Verarbeitung des Bleiniederschlags auf Purinbasen musste nun um so nothwendiger erscheinen, als wir in den Bauchorganen von Kaninchen eine Base fanden (die anderwärts beschrieben werden soll), welche im Gegensatz zum Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Adenin schon durch basisches Bleiacetat, ohne Zusatz von Ammoniak, gefällt wird.

Bestimmung bekannter Guaninmengen in Extracten von Rinds- und Kaninchenmuskeln.

Versuch XXI (LI): Je 250 g geschabtes Rindfleisch wurden verarbeitet, die eine Hälfte für sich, die andere nach Zusatz von 50 ccm. einer salzsauren Guaninlösung, welche 41,20 mg N enthielt.

Jede Probe wurde zuerst 12 Stunden bei ca. 50° mit 750 ccm. Wasser, der ausgepresste Rückstand noch 2 Mal mit je 400 ccm. Wasser extrahirt, die vereinigten Filtrate durch Aufkochen mit Essigsäure vom Eiweiss befreit, eingeeengt und in zwei gleiche Theile getheilt. Ein Theil wurde mit Ammonsulfat, der andere, zum Vergleich, nach der oben angegebenen Methode mit basischem Bleiacetat behandelt, die zur Silberfällung vorbereitete Flüssigkeit genau halbirte, jede Hälfte für sich ausgefällt und im Niederschlag der Stickstoff bestimmt.

I. Ammonsulfatmethode:

Die guaninfreie Fraction wurde genau wie im Versuch XX behandelt.

Gefunden wurden	1. 17,5 mg N,
	2. 15,4 > >
	im Mittel 16,5 mg N.

Die Guaninfraktionen, deren jede 10,3 mg Guanin-N enthielt,

lieferten	1. 14,56 mg N,
	2. 14,14 > >
	im Mittel 14,35 mg N,

berechnet waren	16,5 + 10,3 = 26,8 > >
also bestand ein Deficit von	12,5 mg N.

Die guaninfreien Portionen lieferten,	
im Filtrat vom Bleiniederschlag	16,7 mg N,
im Bleiniederschlag («Correctur»)	2,0 » »
zusammen	18,7 mg N.

Die Guaninportion gab	
im Filtrat vom Bleiniederschlag	26,06 mg N,
im Bleiniederschlag («Correctur»)	2,95 » »
zusammen	29,01 mg N,
berechnet waren $18,7 + 10,3 =$	29,00 » »

Versuch XXII (LII): Muskeln und Knochen eines Kaninchens zusammen in der Fleischhackmaschine zerkleinert, 400 g des Gemenges ohne Guaninzusatz, 400 g nach Zusatz von 75 ccm. Guaninlösung, entsprechend 61,80 mg N verarbeitet, jede Portion in zwei gleichen Hälften nach der Ammonsulfat- und der Bleimethode behandelt; Extraction der Muskeln mit Wasser wie im Versuch XXI.

Ammonsulfatmethode:

die guaninfreie Portion lieferte	38,64 mg N,
die Guaninportion	34,5 » »
berechnet waren $38,64 + 15,45 =$	48,9 » »
somit ein Deficit von	14,4 mg N.

Bleimethode:

die guaninfreie Portion lieferte	26,4 mg N,
die Guaninportion	33,2 » »
berechnet waren $26,4 + 15,45 =$	41,9 » »
somit ein Deficit von	8,7 mg N.

Die Ursache dieses Deficits kann nur in dem Umstand liegen, dass eine ungewöhnlich grosse Menge von Basenstickstoff in dem Bleiniederschlag gefunden wurde (13,16 mg, gegen 4,06 mg «Correctur» im Versuch 51) und dass die bei Zerlegung des Bleiniederschlags freigewordenen Albumosen die vollständige Fällung der Basen verhindert haben. Ausserdem aber war denkbar, dass die Extraction des Muskelfleisches durch warmes Wasser unvollkommen gewesen; daher wiederholten wir den Versuch in der Weise, dass wir das Guanin der

ammoniakale des vorliegenden, vom Eiweiss befreiten Auszuges zersetzen.

Versuch XXIII (LIII): 250 g Kaninchenmuskeln mit Knochen, fein gewiegt, wurden mit 500 ccm. Wasser bei 50—60° zwei Stunden digerirt, filtrirt, das Filtrat vom Eiweiss befreit und in zwei gleiche Hälften getheilt. Die eine wurde für sich behandelt, die andere mit 25 ccm. Guaninlösung, entsprechend 20,6 mg N versetzt. Jede Hälfte wurde bis zu amphoterer Reaction neutralisirt, mit basischem Bleiacetat vollständig ausgefällt, filtrirt; aus Filtrat und Niederschlag das Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Schwefelblei mehrfach mit Wasser ausgekocht, die Filtrate vereinigt, eingeeengt, halbtirt und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt.

Die guaninfreien Portionen gaben	
im Filtrat vom Bleiniederschlag (Mittel	
aus beiden Bestimmungen)	9,8 mg N,
im halben Bleiniederschlag (Correctur)	0,2 „ „
zusammen	10,0 mg N.
Die Guaninportion gab	
im Filtrat vom Bleiniederschlag	13,8 mg N,
im halben Bleiniederschlag (Correctur)	0,3 „ „
zusammen	13,8 mg N,
berechnet waren 10,0 + 10,3 (für die	
Hälfte des Guanins) =	20,3 „ „
somit ein Deficit von	6,5 mg N.

Aus diesen Versuchen ergibt sich:

11. dass die Bestimmung des Basenstickstoffs nach der Ammonsulfatmethode in Organextracten sehr beträchtliche Fehler gibt, indem zu wenig Stickstoff gefunden wird. Da diese Methode in Lösungen, welche nur Albumosen enthalten, befriedigende Resultate gibt, muss angenommen werden, dass in Organauszügen ausser den Albumosen noch andere Stoffe vorhanden sind, welche die Fällung des Guanins als Silbersalz verhindern. Möglicher Weise sind dies die Nucleinsäuren, die ja, wie Kossel gefunden und Schmiedeberg bestätigt hat, mit den Purinbasen durch Silber nicht vollständig fällbare Verbindungen bilden; doch ist nicht ausgeschlossen, dass auch andere Stoffe die gleiche hemmende Wirkung ausüben.

extract, Versuch 51) ein gutes Resultat; in Versuch 52 und 53 (Auszug von Kaninchenmuskel) aber erhebliches Deficit.

Die Ursache desselben ist in Folgendem zu suchen: Bei der Fällung mit basischem Bleiacetat bleiben die Purinbasen zum grösseren Theil in Lösung, zum kleineren gehen sie in den Niederschlag über. Der Niederschlag wurde mit SH_2 zerlegt; dadurch werden die Basen in Freiheit gesetzt, zugleich aber auch die Albumosen und anderen Stoffe, welche die Silberfällung verhindern. Es sind da dieselben Schwierigkeiten zu überwinden, wie sie oben beim Fällen in albumosenhaltigen Lösungen geschildert sind. Mehrfach ist es uns begegnet, dass ein Silberniederschlag überhaupt erst nach Zusatz von Ammonsulfat entstand, und wir sehen, dass genaue Werthe bei Gegenwart von Albumosen nicht zu erhalten sind. Die Menge der durch das Bleiacetat gefällten Basen ist wechselnd und nicht unbeträchtlich. Aus reinen Lösungen wird Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin durch basisches Bleiacetat (ohne Ammoniak) zwar nicht gefällt, doch können, wie Krüger und Salomon (Zeitschr. f. physiol. Chemie, XXIV, S. 364 ff.) zeigten, Xanthin und 1-Methylxanthin durch ausfallende Farbstoffe mitgerissen werden. Im Kaninchenkörper kommt die obengenannte Base in Betracht, welche zur Xanthingruppe gehört und aus reiner Lösung durch basisches Bleiacetat gefällt wird, und deren Menge in gewissen Extracten nicht unbeträchtlich ist, so dass Fehler in deren «Correctur», sei es ein Zuviel durch mitgerissenen Albumosenstickstoff, sei es ein Verlust durch unvollkommene Ausfällung unvermeidlich ist.

13. *Es geht aus alledem die Thatsache hervor, dass wir eine für alle Fälle gültige Methode der Basenbestimmung nicht besitzen.*

Fällung in albumosenhaltiger Lösung liefert je nach dem Gehalt der Basen und Albumosen entweder gar keine, oder eine nur unvollkommene Fällung, welche zwar durch Zusatz von Ammonsulfat erleichtert wird, alsdann aber Albumosen einschliesst und von diesen nur durch mehrfaches, mit Verlusten verbundenes Umfällen befreit werden kann. Oder bei geringem Albumosen-

gerade dann sofort ein Niederschlag aus, der aber wiederum Albumosen einschliesst und, bei direkter Bestimmung, zu hohe Resultate gibt.

Die Entfernung der Albumosen durch Sättigen mit Ammonsulfat liefert unter den obengenannten Cautelen in reinen Albumosenlösungen gute Resultate, lässt aber bei Organextracten in Stich, weil noch andere fällungshindernde Substanzen (Nucleinsäuren?) zugegen sind.

Die Bleiacetatmethode gibt in einzelnen Fällen (Rindsmuskel) gute, in anderen (Kaninchenmuskel) unbefriedigende Werthe, ist indessen das einzige Verfahren, das, wenigstens unter Umständen, brauchbar ist.

Bei Bestimmung in einem bisher ungeprüften Organ ist die Zulässigkeit derselben zuerst zu prüfen, indem man einem Theil des Organauszuges eine gemessene Menge einer bekannten Base zusetzt und ermittelt, ob der hierdurch bedingte Zuwachs an Basen-N in der Analyse richtig zum Ausdruck kommt.

Prüfung der Kupferfällung nach Krüger-Wulff

Bei der Schwierigkeit, durch Silberfällung befriedigende Resultate zu erhalten, haben wir auch die Fällung der Basen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid nach Krüger-Wulff geprüft. Der Stickstoffgehalt des hierbei ausfallenden Niederschlages darf nicht direkt bestimmt werden, da nach Huppert Eiweisskörper, Rhodan, nach Burian und Schur Albumosen und überhaupt noch zahlreiche andere Stoffe in denselben enthalten sein können. Wir haben den Niederschlag mit Schwefelkalium zersetzt, das Filtrat nach Entfernung des Schwefels mit ammoniakalischem Silber gefällt und den Stickstoff in diesem Niederschlag bestimmt. Die Werthe sind durchweg höher, als bei direkter Silberfällung, z. B.:

	Silberfällung direkt	Silberfällung nach Kupferfällung
Versuch XIV,*) in 100 g Organen	0,0976	0,1556
„ „ „ Muskel	0,0233	0,0478
„ XV „ Muskel	0,0857	0,0958
„ XVI „ Organen	0,0644	0,1101
„ „ „ Muskel	0,0324	0,0354

*) Versuchsnummern unserer Protokolle.

wir fanden, dass die obenbeschriebene Base, gleich dem Coffein, Theobromin, nach Krüger-Wulff nicht gefällt wird, die Kupferfällung also, trotzdem sie mehr Stickstoff liefert als die direkte Silberfällung, den Basenstickstoff nicht vollständig enthält.

Ueber den Nachweis der Harnsäure im Blut und in Organauszügen.

Der Eingangs erwähnte Plan unserer Untersuchung erforderte die möglichst genaue Bestimmung der Harnsäure im Blut und den Organen der Versuchsthiere. Zur Bestimmung im Blut hat v. Schröder (Beiträge zur Physiologie, C. Ludwig gewidmet, 1887, S. 89) das Salkowski-Maly'sche Verfahren soweit verfeinert, dass er 1 mg Harnsäure, 100 ccm. defibrinirtem Rinderblut zugesetzt, wiederfinden konnte; etwas grössere Mengen gewann er mit Verlusten von 0,2 bis 1,8 mg quantitativ wieder.

Bei der Ausführung dieses vielfach benutzten Verfahrens fanden wir gelegentlich Schwierigkeiten beim Enteiweissen des Blutes und bei der Zerlegung des harnsauern Silbermagnesiumsalzes durch Schwefelwasserstoff.

v. Schröder befreit das Blut vom Eiweiss zuerst bei neutraler, dann im Filtrat bei schwach saurer Reaction. Beide Fällungen bleiben zuweilen aus; Zusatz von Kochsalz, abwechselndes Zuträufeln von Essigsäure und kohlensaurem Natron und andere kleine Hülfsmittel helfen öfters; lassen sie im Stich, so ist der Zusatz eines Eisensalzes zu versuchen. Vom Citrat, Acetat und Eisenammoniak sahen wir keinen Vortheil, wohl aber von einigen Tropfen Eisenchloridlösung. Es war nur zu fürchten, dass dieses kräftige Oxydationsmittel einen Verlust an Harnsäure bewirkte; dies ist wohl der Fall, doch ist der Verlust relativ nicht sehr bedeutend. In einem Fall fanden wir von 0,1053 g Harnsäure 0,1014 g wieder, also einen Verlust von 3,9 mg = 3,7%.

Versuche, durch Zusatz von Magnesium- oder Ammoniumsulfat die Fällung zu erleichtern, ergaben kein günstiges Resultat, indem die Harnsäure grösstentheils mit den Eiweisskörpern ausfiel.

Die Zerlegung des Silbermagnesiumniederschlags hat

vorgenommen, um die Berührung der Harnsäure mit freiem Alkali zu vermeiden. Die Entsilberung mit Schwefelwasserstoff ist indessen nur dann vollständig, wenn das Gas stundenlang eingeleitet wird (Taylor, Camerer s. o.) und das Schwefelsilber fällt bei Gegenwart kleiner Eiweiss- oder Albumosenmengen (besonders bei nicht ganz frischem Blut oder wenn das Enteiweissen lange gedauert hatte) colloïd aus und geht, selbst wenn bis zur Trockne eingedampft wurde, in gleicher Form wieder in Lösung. Wir sind daher zur Anwendung des Schwefelkaliums zurückgekehrt, bei dem die Zerlegung des Niederschlages weit rascher erfolgt, und haben die schädliche Wirkung des freien Alkali dadurch vermieden, dass wir sofort nach Bildung des Schwefelsilbers die Flüssigkeit mit Essigsäure schwach ansäuerten; dabei ballt sich das Schwefelsilber (begünstigt durch die Anwesenheit eines Neutralsatzes) sehr rasch zusammen und das Filtriren macht keine Schwierigkeit.

Der durch Anwendung des Schwefelkaliums bewirkte Harnsäureverlust ist offenbar sehr gering, wie die nachstehenden Kontrollanalysen beweisen.

Harnsäure gesucht :	Harnsäure gefunden :
26,4 mg	26,1 mg
26,6 "	27,9 "
18,3 "	19,5 "
8,5 "	8,7 "
8,5 "	7,5 "
8,5 "	8,0 "
6,8 "	6,3 "
6,8 "	6,8 "
6,8 "	8,7 "
6,8 "	6,7 "

Alle Proben waren mit 100—200 ccm. defibrinirtem Rinderblut angestellt, die Harnsäure aus dem Stickstoffgehalt des Silberniederschlags bestimmt. Der geringe Ueberschuss, der in einzelnen Fällen gefunden wurde, rührt wahrscheinlich von Ammoniakretention beim Auswaschen her, da bei Anstellung jener Versuche die Arbeiten von Salkowski, Camerer und die Methode von Arnstein noch nicht erschienen waren.

Harnsäure bekanntlich schwieriger und weniger genau, als im Blut. Für die Herstellung der Auszüge und die Silberfällung der Säure sind eine Anzahl von Vorschriften vorhanden.

Meissner (Zeitschr. f. ration. Medicin 31) extrahierte die Organe von Hühnern mit warmem Wasser, befreite vom Eiweiss durch Kochen, fällte das (vom Leberglycogen) opalescente Filtrat mit Baryt und bemerkte, dass Harnsäure «nicht oder nur in seltenen Fällen» in den Barytniederschlag übergeht.

Salkowski (Virchow's Archiv 31, S. 166, 1880), Bockendahl und Landwehr (ebenda 84, S. 561, 1881), Salomon, (Zeitschr. f. phys. Chemie II, S. 65) u. A. zogen ebenfalls mit Wasser aus, befreiten vom Eiweiss durch Kochen, fanden es aber nothwendig, wenigstens die Hauptmenge der Albumosen durch Zusatz des doppelten bis vierfachen Volumens Alkohol aus dem Filtrat vor der Silberfällung zu entfernen. Stadthagen (Virchow's Archiv 109, S. 390, 1887) ging von der Möglichkeit aus, es möchte die Harnsäure in zusammengesetzten, durch Silber nicht fällbaren Verbindungen innerhalb der Organe vorhanden sein, daher behandelte er die Organe 12—24 Stunden mit kochender, verdünnter Schwefelsäure, filtrirte, fällte die Schwefelsäure durch Baryt nahezu vollständig aus, neutralisirte genau mit kohlensaurem Baryt und filtrirte nach 24 Stunden. Ebenso behandelte er den mit Schwefelsäure ausgezogenen Organrest, befreite die vereinigten Filtrate durch Kochen und Ansäuern und, wenn dies nicht vollständig gelang, durch Verdauen mit Pepsin von Eiweiss. Auf diese Art konnte er von einigen Deci- oder Centigrammen Harnsäure, die einem Kilo Fleisch zugesetzt waren, 80—85 % wiedergewinnen.

Nach Abschluss unserer Untersuchungen hat Wiener, (Ueber Zersetzung und Bildung von Harnsäure im Thierkörper, Arch. f. exp. Pathologie 42, S. 381) die Genauigkeit des Harnsäurenachweises in Organextracten nachgeprüft, da er sich überzeugete, dass «alle in der Litteratur angegebenen Wege keine befriedigenden Resultate gaben». Zu seinem besonderen Zweck extrahierte er die Organe bei 38° unter Schütteln, fällte das Eiweiss durch Kochen und Essigsäurezusatz, wusch die

Erwässerung durch Harnsäure mit nach Lösung anschauen aus, engte ein und fällte ohne vorherige Entfernung der Albumosen, nach Ludwig-Salkowski.

Den Silberniederschlag zersetzte er mit Schwefelnatrium, das durch Einleiten von SH_2 in 30%ige Lösung von kohlen-saurem Natron hergestellt war; das bei Gegenwart von Eiweiss colloide Schwefelsilber fällte er durch einige Tropfen gesättigter Lösung von Aluminiumacetat, kochte das Filter mitsammt dem Schwefelsilber mehrfach aus und engte die vereinigten Filtrate ein. Zugleich mit der Harnsäure fielen Fettsäuren aus, die durch kochenden Alkohol extrahiert wurden; dann wurde mit Schwefelkohlenstoff, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und die Harnsäure als solche gewogen.

Nach diesem sorgfältigen Verfahren fand Wiener 89—91% der zu Blut, Hühnereiweiss oder Lebercolatur zugesetzten Harnsäure wieder.

Bei allen diesen Methoden sind bei der Silberfällung der Harnsäure Albumosen zugegen, und da die Resultate nicht unbefriedigend sind, ist anzunehmen, dass die Fällung der Harnsäure weniger als die der Basen durch Albumosen beeinträchtigt wird. Dies hat schon Stadthagen angegeben (a. a. O.), Kontrollversuche haben es uns bestätigt. So erhielten wir durch Silberfällung einer Lösung, die 65 mg Harnsäure enthielt, bei einem Peptongehalt von 0,02% 55 mg, bei 0,5% Pepton 60 mg der Harnsäure wieder. Nur darf kein allzugrosser Ueberschuss von Ammoniak zugesetzt werden und nimmt das Absitzen des Niederschlages mehrere Stunden in Anspruch. Auffallend ist, dass bei Gegenwart von Albumosen die Harnsäure durch ammoniakalische Silberlösung (ohne Magnesiummischung) selbst bei längerem Stehen nicht reducirt wird.

Diese Unabhängigkeit der Harnsäurefällung vom Albumosengehalt beweist, dass man nach der Stadthagen'schen Methode nur relativ geringfügige Verluste erleidet, sofern man alle anderen Fehlerquellen vermeidet. Weniger günstig erwies sich die Wasserextraction und Fällung der Albumosen durch Alkohol nach Salkowski; es gingen öfters Harnsäuremengen von mehreren Centigrammen verloren.

Anfangs beträchtliche Verluste, welche, wie sich herausstellte, beim Behandeln mit Baryt und Lithioncarbonat sich einstellten. Das endgiltige Verfahren war folgendes: Die gewogenen Organe oder Muskeln werden in grossen Kolben mit 2 Liter Wasser und 10 cem. concentrirter Schwefelsäure durch 12 Stunden so erhitzt, dass die Flüssigkeit niemals ins Sieden kam. Dabei setzt sich bald das coagulierte Eiweiss zu Boden; die Flüssigkeit bleibt 12 Stunden stehen und wird dann durch grosse Faltenfilter filtrirt, was sehr rasch vor sich geht. Der Filtrerrückstand wird noch zweimal mit Schwefelsäure von 0,5 Volumprocent in der Wärme je 2—3 Stunden extrahirt, sämtliche Filtrate (die, wenn das Sieden vermieden wurde, klar sind) vereinigt und mit soviel Barythydrat versetzt, als der zugesetzten Schwefelsäure entspricht; hierbei kommt in der Lösung ein geringer Ueberschuss von Baryt, da etwas Schwefelsäure im ausgefällten Eiweiss zurückgehalten wird. Harnsäure geht in den Barytniederschlag in der Regel nicht über, obwohl der saure harnsaure Baryt nach Allan und Bensch (Ann. der Chemie und Pharmacie 65, S. 181, 1848) in Wasser fast unlöslich ist. Bereitet man eine Lösung von Harnsäure in kohlensaurem Lithion und setzt Aetzbaryt zu, so kann man im ausgefallenen kohlen-sauren Baryt, nach Auflösen in Salzsäure, Harnsäure gewinnen und durch die Murexidprobe nachweisen. In den Organextracten hatten wir Anfangs Verluste hierdurch; sie lassen sich indessen vermeiden, wenn der Baryt nur in geringem Ueberschuss zugesetzt wird. Der Niederschlag von schwefelsaurem Baryt sitzt, bei gelinder Wärme, in einigen Stunden gut ab; es wird filtrirt, kohlen-saures Lithion bis zu neutraler Reaction zugesetzt und, während der Niederschlag absitzt, von Zeit zu Zeit mit Essigsäure von Neuem neutralisirt. Auch dieser Niederschlag setzt sich am besten bei 30—40°. Eine Probe der überstehenden Flüssigkeit darf weder mit Baryt noch mit Lithioncarbonat mehr Trübung geben. Ist dies, eventuell durch nachträglichen Zusatz, erreicht, so wird filtrirt, mit heissem Wasser mehrfach nachgewaschen, das Filtrat eingeeengt (wobei Albumosen flockig ausfallen),

eventuell nochmals inkrust, dann im Ganzen oder in einzelnen Portionen die Fällung mit Silber vorgenommen.

Mehrfache Kontrollversuche zeigten, dass die auf solche Weise enthaltenen Barytniederschläge weder Harnsäure noch Alloxurbasen enthalten.

Die Verarbeitung der Silberniederschläge geschieht, wie oben beim Blut beschrieben: die Harnsäure wurde, wenn ungefärbt, durch Wägung, sonst durch Stickstoffbestimmung gemessen, in jedem Falle an einem Minimum derselben die Murexidprobe ausgeführt.

Kontrollversuche.

Kaninchen- muskel	Harnsäure	
	zugesetzt:	gefunden:
130 g	22,4 mg	22,6 mg + 0,2 mg
130 >	38,1 >	36,2 > — 1,9 > = 95,0%
130 >	49,6 >	48,2 > — 1,4 > = 97,2%
130 >	113,2 >	104,5 > — 8,7 > = 93,3%
295 >	129,8 >	117,4 > — 12,4 > = 90,4%

Es wäre nun werthvoll gewesen, die Harnsäure und die Purinbasen in ein und demselben Extract bestimmen zu können. Wir sehen aber, dass die Basen in albumosenhaltiger Lösung nicht gefällt werden können. Daher untersuchten wir, ob nach Entfernung der Albumosen nach der Ammonsulfat- oder Bleimethode die Harnsäure noch quantitativ bestimmt werden könne.

In gesättigter Lösung von Ammonsulfat ist die Harnsäure an sich nicht löslich, bleibt aber, in gelöster Form zugesetzt, ziemlich lange in übersättigter Lösung, namentlich in Gegenwart von Albumosen fällt das harnsaure Ammon selbst nach mehreren Tagen nur unvollständig aus, sodass die Harnsäure theils im Albumosenniederschlag, theils im Filtrat erscheint. In Letzterem fanden wir in einem Versuch statt 85 mg nur 47 mg. Ebenso bei Anwendung schwefelsaurer Magnesia zur Albumosenfällung. Es ist somit diese Methode zur Bestimmung der Harnsäure nicht brauchbar. Dasselbe gilt für die Fällung der Albumosen mit basischem Bleiacetat, welches ebenso den grössten Theil der Harnsäure als Bleisalz fällt.

muss das schwefelsaure Extract, nach Behandlung mit Baryt und Lithioncarbonat, in zwei Hälften getheilt werden, deren eine auf Harnsäure, die andere auf Basen verarbeitet wird.

14. *Die Fällung der Harnsäure als Silbermagnesiumsalz wird durch Albumosen in geringer Menge nicht verhindert.*

Für den Nachweis in Organen ist die Extraction mit halbproucentiger Schwefelsäure nach Stadthagen geeignet. Bei richtiger Ausführung werden 90—97% der zugesetzten Harnsäure wiedergefunden.

Die Ammonsulfat- und Bleiacetatmethode ist zum Nachweis der Harnsäure nicht geeignet. Daher muss der schwefelsaure Organextract auf Harnsäure und Basen in zwei Hälften getrennt verarbeitet werden.

Untersuchungen über den Blutfarbstoff.

Von

M. Nencki und J. Zaleski.

Mit einer Tafel und drei Abbildungen.

(Der Redaction zugegangen am 9. Juli 1900.)

I. Ueber die Aether des Hämins.

Es sind nahezu 50 Jahre seit der Entdeckung der Häminkrystalle durch Teichmann verflossen und bis auf den heutigen Tag sind die Chemiker über die Zusammensetzung dieses Körpers nicht einig. Wohl findet jeder Autor, dass die, nach dem von ihm ausgearbeiteten Verfahren dargestellten Häminkrystalle bei den Elementaranalysen unter einander übereinstimmende oder nahezu übereinstimmende Zahlen ergeben, die aber mit den Analysen seiner Vorgänger nicht übereinstimmen. Da bei der Reinigung und Analyse seines Präparates der Autor es an der nöthigen Sorgfalt nicht fehlen liess und das Präparat bei der mikroskopischen Besichtigung ihm keine fremden Beimengungen und mehr oder weniger homogene Krystalle zeigt, so kommt er meistens zu dem Schluss, dass die Präparate seiner Vorgänger noch nicht hinreichend von fremden Beimengungen befreit wurden, jedenfalls nicht so rein wie das seinige waren. Hie und da wurde die Ansicht ausgesprochen, dass es verschiedene Hämine geben muss, warum aber bei verschiedenen Darstellungsmethoden verschiedene Hämine erhalten werden, war bis jetzt unbekannt.

Seit den ersten, im Jahre 1884 publicirten Untersuchungen von M. Nencki und N. Sieber über das Hämin und das Hämatin sind nach einer längeren Pause in den letzten Jahren

namentlich die von W. Küster und seinen Mitarbeitern, von M. Cloetta,¹⁾ M. Bialobrzewski,²⁾ K. A. H. Mörner,³⁾ M. Chalféieff,⁴⁾ Cazeneuve und Breteau⁵⁾ und M. Rosenfeld.⁶⁾ In den meisten dieser Arbeiten sind werthvolle Beiträge zur Kenntniss dieses Farbstoffs enthalten. Die Thatsache, dass das Hämin kein salzsaures Salz des Hämatins ist, sondern dass im Hämin das Chlor an Kohlenstoff oder Eisen gebunden ist, wird nicht mehr bezweifelt. Uebereinstimmend wird angegeben, dass das Chlor des Hämins durch langes Waschen mit heissem Wasser fast vollständig entfernt resp. durch Hydroxyl ersetzt, ebenso dass auch das Eisen des Hämins durch Alkalien in der Wärme theilweise abgespalten wird. Die Angabe von Cloetta und Rosenfeld, dass im Hämin auf 1 Atom Eisen nur 3 Atome Stickstoff enthalten sind, wurde als durch die Einwirkung von concentrirter SO_4H_2 auf das Hämin resp. durch die Schwierigkeit, bei den Elementaranalysen aus dem Hämin allen Stickstoff auszutreiben, hinreichend als unrichtig aufgeklärt.

Für das Verständniss der wahren Ursache, warum von verschiedenen Autoren je nach dem Darstellungsverfahren Hämine von verschiedener procentischer Zusammensetzung erhalten werden, war in der Häminforschung noch ein weiterer Schritt nothwendig, nämlich die Erkenntniss der in Nachfolgendem zu begründenden Thatsachen, dass im Häminmolekül zwei Hydroxyle enthalten sind und dass dieser Farbstoff nicht allein mit ausnehmender Leichtigkeit mit Säure- und Alkylradicalen Aether, sondern selbst mit indifferenten Verbindungen Additionsprodukte bildet.

Der Eine von uns und N. Sieber waren die ersten,

1) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. 36, S. 349, 1895.

2) Ber. d. deutschen chem. Gesellsch., Bd. 29, S. 2842.

3) Nordisk med. Arkiv, Festband 1897, Nr. 1 u. 27.

4) Le physiologiste russe, Vol. 1, p. 15, 1898.

5) Bull. soc. chim., T. 21—22, 1899.

6) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. 40, S. 137.

aus dem Blute extrahirten Häminkrystalle in ihrem Molekül Amylalkohol enthalten, und wir haben schon damals vorausgesetzt, dass die mit Eisessig bereiteten Krystalle in ihrem Molekül Essigsäure enthalten werden. Dies ist auch hernach von F. Hoppe-Seyler¹⁾ bestätigt worden. Diese Thatsachen wurden aber von den späteren Forschern wenig beachtet, obgleich die Verwendung von Alkohol und Mineralsäuren bei der Darstellung der Häminkrystalle wohl den Verdacht erwecken sollte, dass ein geringer Theil des Hämins ätherificirt werden könnte. Der Gedanke, dass die Verschiedenheit der Hämine dadurch bedingt ist, dass dem Hämin par excellence von der Zusammensetzung: $C_{88}H_{31}ClN_4O_5Fe$ mehr oder weniger Additionsprodukte oder Aetherarten beigemischt sind, wurde uns sehr wahrscheinlich, als wir, anlässlich der in unserem Laboratorium ausgeführten Arbeit von M. Bialobrzewski,²⁾ die Beobachtung machten, dass Häminlösungen in Amylalkohol, der etwas Chlorwasserstoff enthielt, längere Zeit erhitzt, ein Produkt lieferten, das sich in Alkalien nicht mehr löste. Wir haben daher, zum Theil gemeinschaftlich mit Hrn. mag. pharm. L. Różycki, die Untersuchung über das Hämin nach dieser Richtung hin wieder aufgenommen, und es ist uns gelungen, mehrere Aether des Hämins rein darzustellen und so verschiedene, anscheinend widersprechende Angaben über das Hämin und Hämatin aufzuklären.

Bevor wir jedoch zur Beschreibung der von uns erhaltenen Verbindungen übergehen, ist es zweckmässig, um Wiederholungen zu vermeiden, einige Worte über die analytischen Methoden vorzuschicken.

Nicht allein die Reindarstellung der so leicht veränderlichen und zersetzlichen Körper ist mit besonderen Schwierigkeiten verbunden; auch die Elementaranalysen der Häminpräparate erfordern gewisse Cautelen, deren Nichtbeachtung zu irrigen Schlüssen führen kann. Es betrifft dies namentlich die Ermittlung des Stickstoffgehaltes. Wir haben schon früher

1) Ber. d. deutschen chem. Gesellsch., Jahrg. 1885, S. 603.

2) Ibid., Jahrg. 1896, S. 2842.

präparaten bei der volumetrischen Bestimmung des Stickgas erst beim direkten Glühen mit Kupferoxyd entweicht und dass es stundenlangen, anhaltenden Erhitzens bis zur Weissgluth eines innigen Gemisches mit pulvrigem Kupferoxyd bedarf, um allen Stickstoff aus der Substanz zu erhalten. In dieser Hinsicht leisten die schwer schmelzbaren Röhren aus Jenaer Glas vortreffliche Dienste und kann das gleiche Rohr mehrere Male benutzt werden. Verbrennungen der Häminpräparate unter Zusatz von chromsaurem Blei sind nicht zu empfehlen, da dann dem aufgefangenen Stickstoff Sauerstoff beigemischt ist, der nachträglich entfernt werden muss. Den gleichen Schwierigkeiten begegnet man, wie Mörner hervorhebt, bei der Stickstoffbestimmung in Häminpräparaten nach Kjeldahl. Nach der ursprünglichen Kjeldahl'schen Methode (Erhitzen mit Schwefelsäure nebst Phosphorsäureanhydrid, bis die Flüssigkeit nur noch schwach gefärbt war, und Oxydation mit Kaliumpermanganat) wurden stets, auch bei sehr andauerndem Erhitzen, zu niedrige Stickstoffwerthe erhalten, dies um so mehr, je kürzer die Erhitzung war. Wenn nach Wilfarth die Zersetzung bei der Gegenwart von Quecksilberoxyd ausgeführt wurde und das Erhitzen nicht nur so lange, bis Entfärbung eintrat, sondern noch einige Stunden länger bei schwachem Sieden der Schwefelsäure fortgesetzt wurde, erhielt Mörner Werthe, die mit den nach der volumetrischen Methode erhaltenen übereinstimmten. Bei kürzerem Erhitzen wurden viel zu niedrige Resultate erhalten — 7,18% statt 8,28% N und 7,44% statt 8,39% N (vgl. Mörner, Nordiskt medicinskt Arkiv, Festbd. Nr. 1 p. 6).

Dieser Umstand war für Einen von uns Veranlassung zu untersuchen, ob im Häminmolekül ausser Stickstoff nicht etwa Argon enthalten sei.¹⁾ Das Resultat war negativ. Aller Wahrscheinlichkeit nach bilden sich beim Erhitzen der Hämatinpräparate Produkte, wie z. B. das Paracyan, aus welchen nur schwierig der Stickstoff abspaltbar ist.

1) J. Zaleski, Ber. d. deutschen chem. Ges., Jahrg. 1897, S. 965.

Erhitzen mit NO_3H und NO_3Ag in zugeschmolzenem Rohr bestimmt. Da das Chlor durch die Waschflüssigkeiten aus den Häminpräparaten entfernt wird, so empfiehlt es sich, den betreffenden Flüssigkeiten (Alkohol, Aceton, Wasser) 0,5—0,1% HCl zuzusetzen. Beim Trocknen der Substanz, anfangs zwischen Fliesspapier, später über concentrirter SO_4H_2 und Aetznatron in vacuo, entweicht der überschüssige Chlorwasserstoff vollständig. Es empfiehlt sich ferner, wenn der Häminniederschlag anfangs z. B. mit Alkohol, später mit Wasser ausgewaschen werden soll, den Alkohol stufenweise zu verdünnen, indem man anfangs 50%, dann 30%, dann 10% Alkohol und zuletzt Wasser zum Auswaschen verwendet.

Wie weiter unten gezeigt werden wird, krystallisiren die verschiedenen Hämine in verschiedenen Systemen. So gehören die Krystalle des Acethämins dem triklinischen System an, während die Aether des Hämins mit Alkylradicalen verschiedene Formen des rhombischen Systems zeigen. Eine mikroskopische Untersuchung im Polarisationsmikroskope, wie er für mikrokrystallographische Messungen verwendet wird, belehrt uns sofort, ob wir es mit einer einheitlichen Substanz oder einem Gemisch verschiedener Hämine zu thun haben.

Vorzügliche Dienste hat uns die Zeissel'sche¹⁾ Methode der Methoxyl-, eigentlich Alkyloxybestimmung, geleistet. Obgleich wir, speciell bei dem Hämin- und Hämatoporphyrinäther, auch bei Präparaten, deren Elementaranalyse scharf mit der berechneten Formel übereinstimmte, manchmal ein Deficit zwischen 0,4—1% von den theoretischen Werthen hatten, so konnten wir immer mit hinreichender Schärfe bestimmen, ob die betreffende Verbindung ein oder zwei Hydroxyle enthält. Den Grund dieses Deficits haben wir nicht aufgeklärt. Wir haben das aus dem Alkyljodid erhaltene AgJ nach dem kürzlich von L. Vanino und O. Hauser²⁾ beschriebenen Ver-

1) Vergl. hierüber: Anleitung zur quantitativen Bestimmung der organischen Atomgruppen von Dr. Hans' Meyer, Berlin 1897, S. 45.

2) Ber. d. deutschen chem. Gesellsch., Jahrg. 1899, S. 3615.

Genalt an Chlorsilber wiederholt geprüft. Die filtrirte mit heisser Salpetersäure versetzte Lösung gab mit Salzsäure keinen wägbaren Niederschlag. Dem erhaltenen AgJ war demnach kein AgCl, etwa von dem Chlor des Hämins herstammend, beigemischt. Nach der Methode von J. Herzig und H. Meyer¹⁾ haben wir auch constatiren können, dass in den Häminen kein Alkyl an Stickstoff gebunden ist und folglich der Stickstoff hydrolytisch aus den Häminen nur als Ammoniak abgespalten werden kann.

Acethämin.

In dem in Moskau in französischer und deutscher Sprache von Prof. Morochowetz herausgegebenen Journal «Le physiologiste russe»²⁾ hat Herr Schalfjeff die interessante Beobachtung mitgetheilt, dass die aus defibrinirtem Blute bei Erwärmen mit Eisessig erhaltenen Häminkrystalle durch Auflösen in chininhaltigem Chloroform — auf 1 g Hämin 1 g Chinin in 50 g Chloroform — und Vermischen der Lösung mit salzsäure- oder essigsäurehaltigem Alkohol umkrystallisirt werden können. In chininhaltigem Chloroform löst sich das Hämin, bei gelindem Erwärmen während 10—15 Minuten, allmählich auf mit Hinterlassung eines wenig gefärbten, geringen Rückstandes, von Schalfjeff «carcasse» genannt; und wenn die davon abfiltrirte, warme Lösung mit essig- oder salzsäurehaltigem Alkohol langsam unter Umrühren versetzt wird, so bilden sich alsbald die charakteristischen Krystalle, auf die wir später noch zurückkommen werden. Man erhält circa 85% der angewandten Krystalle wieder; etwa 6% bleiben in Chloroform ungelöst als «carcasse» zurück; der Rest ist in der Mutterlauge der Krystalle gelöst. Schalfjeff ist der Ansicht, dass das Hämin aus 2 Substanzen besteht, wovon die eine — die «carcasse» — ungefärbt und nur wenig Eisen

¹⁾ Vergl. Hans Meyer l. c. S. 72 und Wiener Monatshefte für Chemie, 15, 613 u. 16, 599.

²⁾ Le physiologiste russe. Vol. I. 15. Moscou 1898.

angesäuertem Alkohol abgeschiedenen Krystalle — stark eisenhaltig ist. Elementaranalysen der Krystalle oder der «carcasse» wurden von Schalfjeff nicht gemacht.

Bei der Wiederaufnahme unserer Untersuchungen über das Hämin haben wir schon anlässlich der Arbeit des Herrn Bialobrzski gesehen, dass die Ausbeute an Hämin nach der Vorschrift von Schalfjeff eine grössere als bei der Extraction des Hämoglobins mit Amylalkohol ist. Allerdings ist die Operation auch viel kostspieliger. Wir haben für unsere Untersuchung, sowie für die Darstellung des Hämatoporphyrins, mehr als ein halbes Kilo Hämin durch Extraction des Blutes mit Eisessig dargestellt und einen grossen Theil davon entweder in ammoniakalischem Alkohol oder in chininhaltigem Chloroform nach Schalfjeff gelöst und in beiden Fällen aus Eisessig umkrystallisirt. Nach unseren Erfahrungen ist folgendes Verfahren das zweckmässigste, um ein Produkt, das wir Acethämin nennen werden, zu erhalten. In einen Liter Eisessig wird pulveriges Kochsalz, bis bei Zimmertemperatur nichts mehr davon gelöst wird, eingetragen und die Lösung auf dem Wasserbade auf 90—95° erwärmt. Jetzt wird zu dem Eisessig 200 ccm. frisches, defibrinirtes und durch Mousseline filtrirtes Blut — wir benutzten meistens Rinder- oder Pferdeblut — zugesetzt. Die Mischung wird unter häufigem Umrühren noch 10 Minuten auf dem Wasserbade erwärmt und, wenn die Temperatur der Lösung wieder 85—90° erreicht hat, durch Mousseline in hohe Bechergläser filtrirt. Schon während des Filtrirens scheiden sich, mit geronnenen Eiweisspartikelchen vermischt, die rothviolett glitzernden Krystalle des Hämins auf dem Mousseline ab. Der Verlust ist aber gering und dafür erhält man ein viel reineres Präparat. Nach 24-stündigem Stehen wird die Essigsäure abgegossen und der Bodensatz von Krystallen 4—5 Mal mit Wasser übergossen, anfangs durch Decantation, schliesslich auf dem Filter mit Wasser, später mit 60—70%igem Alkohol nachgewaschen und die Krystalle in vacuo über SO_4H_2 getrocknet. Aus 100 Liter Eisessig und 20 Liter Blut werden durchschnittlich 110 g

erwärmen wäre noch, dass Ueberschuss von Kochsalz, selbst wenn bei 90° nicht alles gelöst ist, keine störende Wirkung hat. Die Häminkrystalle fallen dann beim Erkalten mit Kochsalz vermengt aus, welches letztere durch Waschen mit Wasser leicht entfernt wird. Mehr als 200, höchstens 220 ccm. Blut auf 1 Liter Eisessig zu nehmen, ist nicht rathsam. Die Ausbeute wird dadurch nicht grösser und der Farbstoff fällt weniger rein, zum Theil amorph aus.

In wässerigen Alkalien ist der getrocknete Farbstoff leicht löslich und wird daraus durch Säuren als Hämatin amorph gefällt. In alkoholischen Lösungen von Ammoniak oder organischen Basen wie Chinin, Trimethylamin, Pyridin u. s. w. ist dieses Hämin ebenfalls löslich und kann daraus unter bestimmten Umständen, auf die wir gleich zu sprechen kommen, krystallinisch erhalten werden. Man kann daraus Hämin von gleicher Krystallform wie die erste Krystallisation oder je nach dem Zusatz von Mineralsäure und verschiedenen Alkoholen Krystalle von ganz verschiedener Form und Zusammensetzung erhalten.

Um die so erhaltenen Krystalle, die wir als Rohacet-hämin bezeichnen wollen, umzukrystallisiren, müssen sie zunächst gelöst werden. Zu dem Zwecke werden 15 Vol. 96 %igen Alkohols mit 4 Vol. Wasser und 1 Vol. wässerigen Ammoniaks (spec. Gew. 0,91) versetzt und 40—60 ccm. davon für je 1 g Hämin verwendet. Nach einer viertel bis halben Stunde bei Zimmertemperatur und häufigem Umschütteln ist die Hauptmenge des Hämins gelöst mit Hinterlassung von geringen Mengen corrodirtcr Häminkrystalle, hauptsächlich aber wenig gefärbter amorpher Partikel. Die filtrirte ammoniakalische Lösung wird jetzt in auf 105—115° vorgewärmten, mit Kochsalz gesättigten Eisessig in kleinen Portionen eingetragen — 4—6 Vol. Eisessig auf 1 Vol. der ammoniakalischen Lösung. Wird weniger Eisessig genommen, so erfolgt die Krystallisation sofort; die Krystalle sind aber klein und mit amorphen Körnern vermengt. Bei mehr als 6 Volumen Eisessig auf 1 Vol. der ammoniakalischen Lösung bleibt viel

haupt keine Krystalle aus.

Die Auflösung der Krystalle kann statt durch NH_3 durch Chinin geschehen, dann ist es aber zweckmässig, statt Alkohol Chloroform zu verwenden. Die besten Verhältnisse sind die von Schafjeff angegebenen. Auf 1 g Hämin 1 g Chinin in 40—50 g Chloroform gelöst und auf 1 Vol. der filtrirten Lösung 4—6 Vol. des heissen mit Kochsalz gesättigten Eisessigs. Das Eingiessen der Chloroformlösung muss, namentlich bei Arbeiten mit grösseren Quantitäten, in dünnem Strahle und unter fortwährendem Umrühren, um Ueberschäumen zu verhüten, geschehen.

Nach dem einen wie nach dem andern Verfahren erhält man für 10 g des Rohproduktes 6—8 g des umkrystallisirten Hämins. Es ist besser, die alkalischen Lösungen nicht zu erwärmen; allerdings 10—15 Minuten langes Erwärmen der Chloroformlösung auf 40—50° beschleunigt die Auflösung des Hämins und das umkrystallisirte Produkt ist rein und von der charakteristischen Krystallform, aber die Ausbeute wird geringer. Beim längeren Erwärmen der alkalischen Lösungen werden überhaupt keine Krystalle erhalten. Nach mehrwöchentlichem Stehen selbst bei Zimmertemperatur verlieren namentlich die ammoniakalischen Lösungen die Fähigkeit, Krystalle zu bilden, offenbar weil alles Hämin in Hämatin übergegangen und zum geringen Theil auch Eisen abgespalten ist. Ein höherer Ammoniakgehalt, auch in der Kälte, ist ebenfalls von Schaden. Statt 70%igen stärkeren oder absoluten Alkohol anzuwenden, hat den Nachtheil, dass das Hämin sich darin weniger löst und zur völligen Lösung mehr Flüssigkeit resp. mehr NH_3 erforderlich ist. Es ist nöthig, genau die mitgetheilten Vorschriften zu beachten, widrigenfalls ist die Ausbeute viel geringer, die Krystalle sind mit amorphen Körnern vermengt oder es scheiden sich beim Erkalten überhaupt keine Krystalle aus.

Statt mit Eisessig haben wir in einigen Versuchen die alkalischen Lösungen mit dem 4—6fachen Volumen auf 100° erwärmter Ameisensäure, normaler Buttersäure und Milchsäure vermischt. Nur aus Buttersäure erhielten wir wohl ausgebildete

die aus Eisessig. Aus Milchsäure waren die Krystalle sehr klein, anscheinend von gleicher Form wie die aus Eisessig; ihr Auslöschungswinkel war bei ca. 28° .

Bei den Elementaranalysen des umkrystallisirten Acethämins erhielten wir folgende Zahlen:

I. Acethämin aus Rinderblut mit Eisessig erhalten, durch Auflösen in alkoholischem NH_3 und Vermischen mit kochsalzhaltigem, auf 108° erwärmtem Eisessig umkrystallisirt. Die abgeschiedenen Krystalle wurden mit Wasser, hierauf stufenweise mit verdünntem, bis zu 80%igem Alkohol gewaschen. Das Wasser wie der Alkohol enthielten 2% HCl . Das Präparat wurde in vacuo über SO_4H_2 und NaOH bis zu constantem Gewichte getrocknet. Hier wie in den nachfolgenden Analysen wurden die Verbrennungen für C und H mit CuO gemacht in der Art, dass das zugeschmolzene Rohr hinten und vorn mit granulirtem CuO beschickt, in der Mitte aber die abgewogene Substanz innig mit pulverigem Bleichromat gemischt wurde. Der Stickstoff wurde über 30%iger KOH aufgefangen und die dadurch verminderte Spannkraft des Wasserdampfes vom Barometerstand abgezogen.

0,2487 g gaben 0,1149 g H_2O u. 0,5706 g CO_2 = 5,14% H u. 62,58% C.
0,2555 g gaben 19,1 ccm. N-Gas bei $19,0^{\circ}$ T u. 762 mm. Bst. = 8,66% N.
0,3085 g gaben 23,1 ccm. N-Gas bei $18,2^{\circ}$ T. u. 758 mm. Bst. = 8,65% N.
0,8199 g gaben 0,1869 g AgCl u. 0,1014 g Fe_2O_3 = 5,64% Cl u. 8,66% Fe.
0,7013 g gaben 0,1548 g AgCl u. 0,0874 g Fe_2O_3 = 5,46% Cl u. 8,72% Fe.

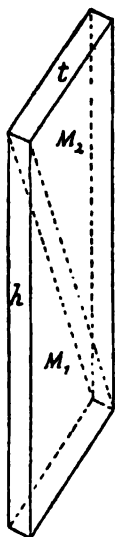
II. Acethämin in chininhaltigem Chloroform gelöst und durch Vermischen der Lösung mit heissem Eisessig auskrystallisirt.

0,2322 g gaben 17,3 ccm. N-Gas bei $18,0^{\circ}$ T. u. 755 mm. Bst. = 8,58% N.
0,4894 g gaben 0,1060 g AgCl u. 0,0601 g Fe_2O_3 = 5,35% Cl u. 8,60% Fe.

III. Acethämin in alkoholischem Ammoniak gelöst und die Lösung mit kochsalzhaltiger, auf 125° erhitzter Buttersäure vermischt. Die abgeschiedenen Krystalle wurden zuerst in vacuo und hierauf bei 105° getrocknet. Der Gewichtsverlust bei 105° betrug 0,2%.

0,3229 g gaben 0,1585 g H_2O u. 0,7393 g CO_2 = 5,45% H u. 62,43% C.
0,2694 g gaben 0,1330 g H_2O u. 0,6177 g CO_2 = 5,49% H u. 62,52% C.

Betrachtung im auffallenden Lichte im Reichert'schen Mikroskope zur Untersuchung der Oberfläche undurchsichtiger Körper ergibt es sich, dass die Ebene M in der Zeichnung von Lagorio eigentlich aus zwei Ebenen M_1 und M_2 besteht.²⁾



Die Ebenen M_1 und M_2 bilden einen sehr stumpfen Winkel, weshalb sie in durchfallendem Lichte den Eindruck einer Fläche machen. Die Fläche t ist meistens sehr stark corrodirt und hat unregelmässige Vertiefungen. Die Krystalle sind so dünn, dass die Ebene h kaum bemerkbar ist. Wegen der Corrosion der Flächen, ihrer Kleinheit und des schwachen Glanzes konnte eine genauere Messung der Flächen- und Kantenwinkel nicht ausgeführt werden. Der Habitus der Krystalle stimmt mit den Zeichnungen des Professors Lagorio und die Grösse des von ihm gemessenen Auslöschungswinkels stimmt ebenfalls mit meinen Messungen überein, so dass die von Prof. Lagorio und mir untersuchten Krystalle als identisch zu betrachten sind.

Es ist zu bemerken, dass anlässlich der Publication von Prof. Schälfejeff³⁾ über die Darstellung des Hämins durch Extraction des defibrinirten Blutes mit Eisessig, die von ihm erhaltenen Krystalle von Professor Lagorio krystallographisch untersucht und das Resultat der Messungen in dem oben citirten Journal veröffentlicht wurde. Die Angaben von Lagorio beziehen sich also auf das nicht umkrystallisirte Rohacethämin. Wie die Bestimmungen von Dr. Weyberg ergeben, wird das Acethämin beim Umkrystallisiren nach den oben ge-

1) Journal der russischen physik.-chemischen Gesellschaft, Bd. 17. S. 36, 1885. Russisch.

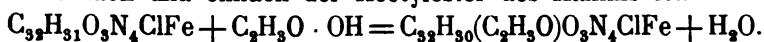
2) Siehe die Figur.

3) Journ. d. russ. phys.-chem. Gesellsch. Bd. 17, S. 30, vgl. auch Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Jahrg. 1885. Ref., S. 232.

Dr. Zemiatschinsky, Professor der Mineralogie an der Petersburger Universität, hatte die Freundlichkeit, auch das Acet-
hämin, das wir aus normaler Buttersäure umkrystallisirten
und dessen Elementaranalysen oben mitgetheilt sind, zu unter-
suchen, und schreibt uns darüber Folgendes:

«Die Krystalle — nach einer Richtung hin ausgezogene
Blättchen — sind Combinationen, wie sie Lagorio unter
Nr. 2 und 3 abgebildet hat; den Auslöschungswinkel habe ich
zwischen 34—30° gefunden, sie sind mit denen von Lagorio
abgebildeten identisch.»

Wie die empirische Formel zeigt, unterscheidet sich das
Acethämin in seiner Zusammensetzung von dem Hämin von
Nencki und Sieber nur durch die Acetylgruppe und man
könnte denken, dass es daraus durch Einwirkung von Eisessig
entstanden und einfach der Acetylesther des Hämins ist.



Weiter unten anzuführende Gründe sprechen gegen diese
Annahme. Wir haben zwar aus dem nicht umkrystallisirten
Rohacethämin beim Zersetzen mit Alkali mit Sicherheit Essig-
säure erhalten. 10 g der über SO_4H_2 und NaOH im Vacuum
bis zu constantem Gewichte getrockneten Krystalle wurden
mit 6%iger Kalilauge 2 Stunden lang am Rückflusskühler
zum Kochen erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Hämatin
durch überschüssige verdünnte SO_4H_2 gefällt und das Filtrat
sammt Waschwasser der Destillation unterworfen. Das zu
Anfang übergegangene Destillat gab mit Eisenchlorid eine
rothbraune Färbung und bei Erwärmen einer Probe des De-
stillates mit Aethylalkohol und SO_4H_2 trat der Geruch nach
Essigäther sehr deutlich auf und als das Destillat mit Alkali
neutralisirt, zur Trockne verdampft und der Rückstand mit
arseniger Säure erhitzt wurde, roch die Schmelze stark nach
Kakodyl.

Als wir den Versuch mit 5 g des umkrystallisirten Acet-
hämins wiederholten und das Destillat zur Entfernung der
mitübergegangenen Salzsäure mit Bleioxyd eingedampft, den
Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und mit SO_4H_2

ernitzt haben, war der Geruch nach Essigäther nicht deutlich wahrnehmbar; auch die Kakodylprobe mit einem anderen Theil des Destillates fiel negativ aus. Allerdings waren hier im günstigsten Falle im Gesamtdestillate nur etwa 0,45 g Essigsäure zu erwarten und das ist vielleicht die Ursache, dass in diesem Versuche die Essigsäure nicht bestimmt nachgewiesen werden konnte.

Den verschiedenen Lösungsmitteln gegenüber verhält sich das Rohacethämin wie das umkrystallisirte durchaus gleich. In verdünnten Alkalien, Ammoniak, Lösungen organischer Basen sind sie leicht löslich. Wird Acethämin mit unzureichender Menge verdünnten — etwa 1‰ — Ammoniaks versetzt, sodass ein Theil der Krystalle ungelöst bleibt, so können aus der ammoniakalischen Lösung nach Zusatz von Alkohol in den früher angegebenen Verhältnissen und Eintragen in heissen, kochsalzhaltigen Eisessig die Krystalle des Acethämins daraus erhalten werden. In verdünnten organischen und Mineralsäuren ist das Acethämin völlig unlöslich; ebenso in Chloroform, Aceton und Aether. Diese Lösungsmittel werden in der Kälte davon gar nicht angefärbt. Etwas löslich ist es in Alkohol, namentlich in 70—80%. In Kapillarröhrchen erhitzt, sintert es gegen 240° und schmilzt selbst bei 300° nicht.

Acethämin im Zeissel'schen Apparate mit JH auf 140° erhitzt, gab in der Silberlösung gar keine Trübung. Um zu sehen, ob etwa darin Alkylradicale an Stickstoff gebunden sind, erhitzen wir das umkrystallisirte Acethämin mit JH in dem Apparate von Herzig und Meyer¹⁾ auf 270—290°. Es wurde zuerst, um die Reagentien auf ihre Reinheit zu prüfen, ein blinder Versuch gemacht. Statt die beiden Kölbchen im Sandbade zu erhitzen, wurden sie in Asbestpappe eingewickelt und dann erhitzt; auch haben wir es zweckmässig gefunden, den Hals der beiden Kölbchen etwas länger zu machen, um die Korke vor der Hitze zu schützen. Nachdem der Apparat zusammengestellt worden, beschickten wir ihn mit 20 ccm. JH und 8 g Jodammonium. Wir erhitzen die Kölbchen bis auf

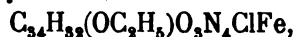
1) Wiener Monatshefte. 15. 613.

Phosphor beschickten Kugelapparat wurde constant auf 60° erhalten. In der Silberlösung entstand Anfangs ein minimaler schwarzer Niederschlag, der bei weiterem Erhitzen sich nicht vermehrte. Wir unterbrachen jetzt das Erhitzen und nach völligem Erkalten beschickten wir den Apparat mit noch 15 ccm. JH und setzten 0,6549 g des umkrystallisirten Acet-
hämins hinzu. Während 2stündigem Erhitzen auf 280—290° bildete sich an dem Zuleitungsröhrchen in der Silberlösung ein unwägbarer brauner Beschlag. Die Silberlösung selbst zeigte nur eine schwache Opalescenz. Wir ziehen daraus den Schluss, dass im Acethämin weder mit dem Hydroxylsauerstoff noch mit dem Stickstoff ein Alkyl verbunden ist.

Den entscheidenden Beweis, dass im Acethämin das Acetyl nicht einen Hydroxylwasserstoff ersetzt, finden wir aber darin, dass das Acethämin gleich wie das Hämin von der Formel $C_{32}H_{31}O_3N_4ClFe$ zwei freie Hydroxyle enthält. Durch Einwirkung von Salzsäure auf eine methylalkoholische Lösung des Hämins erhielten wir das Dimethylhämin:



Andererseits erhielten wir aus dem Acethämin bei entsprechender Behandlung einer äthylalkoholischen Lösung nicht allein den Monoäthyläther des Acethämins:



sondern auch den Diäthyläther:



Bevor wir jedoch zur Beschreibung dieser Aether übergehen, wollen wir mit wenigen Worten die Natur der von Schaffejeff als «carcasse» bezeichneten Substanz aufklären.

Oben wurde mitgetheilt, dass beim Auflösen des Rohacethämins in chininhaltigem Chloroform etwa 6% als wenig gefärbter Rückstand — die «carcasse» — hinterblieben. Unter dem Mikroskope besteht dieser Rückstand aus Krystallfragmenten und amorphen, theils gefärbten, theils ungefärbten Partikeln. Wir haben ihn beim Umkrystallisiren des Acet-
hämins in grösseren Mengen gesammelt, mit Chloroform nachgewaschen und in vacuo über SO_4H_2 getrocknet. Die trockene

verbranntem Horn und hinterliess etwas Asche, aus Eisenoxyd bestehend. Als die Substanz mit metallischem Natrium geglüht und die rückständige Kohle mit etwas Wasser aufgenommen wurde, gab die davon abfiltrirte Lösung mit Nitroprussidnatrium eine stark violette Färbung, ein Zeichen, dass die carcasse auch Schwefel enthält. Eine von Herr Różycki ausgeführte Elementaranalyse der « carcasse » ergab ihm folgende Zahlen:

0,1986 g gaben 0,1120 g u. 0,3936 g CO_2 = 6,26% H u. 54,02% C.
0,2096 » » 23,0 N-Gas bei 16,8° T. u. 751 mm. Bst. = 12,83% N.
0,4682 » » 0,0580 g AgCl u. 0,0366 g Fe_2O_3 = 3,05% Cl u. 5,47% Fe.

Es ergibt sich hieraus, dass die « carcasse » ein Gemisch von etwas ungelöstem Hämin, amorphem Hämoglobin und geronnenem Eiweiss ist.

Der Dimethyläther des Hämins.

An die Möglichkeit der Aetherbildung aus Hämin haben wir schon anlässlich der Arbeit des Herrn Bialobrzeski gedacht, als wir sahen, dass bei längerem Kochen der salzsäurehaltigen amyalkoholischen Lösung das abgeschiedene Hämin in verdünnten wässerigen Alkalien unlöslich wurde und auch der Procentgehalt des erhaltenen Produktes an Kohlenstoff und Wasserstoff erheblich zunahm, während der Gehalt an Stickstoff, Eisen und Chlor entsprechend abnahm. In dieser Vermuthung wurden wir noch bestärkt, als wir nach der Vorschrift von Schälfejeff¹⁾ zum warmen, chlorwasserstoffhaltigen Aethylalkohol die chininhaltige Chloroformlösung des Hämins zugesetzt haben. Die abgeschiedenen Krystalle waren verschieden von den triklinischen Formen, die wir ausschliesslich erhielten, als wir die gleiche Chloroformlösung mit heissem Eisessig vermischten. Sie bestanden grösstentheils aus spindel- und wetzsteinartigen Formen, wie sie öfters die Harnsäure zeigt, daneben waren gut ausgebildete, sechsseitige Tafeln und auch die charakteristischen Krystalle des Acethämins vor-

1) Le physiologiste russe. T. 1, p. 16.

C 63,90 %

H 5,48 %

N 8,77 %

Cl 5,56 %

Fe 8,77 %

C 63,48 %

H 5,43 %

N 8,22 %

Cl 5,21 %

Fe 8,22 %

C 63,95 % und 63,86 %

H 5,79 % > 5,55 %

N 8,53 % > 8,72 %

Cl 5,04 % > 5,42 %

Fe 8,57 % > 8,77 %

Im Dimethylhämin ist der Methylgehalt: 4,69 % CH_3 . Dimethylacethämin enthält 4,40 % CH_3 . Durch vergleichende Versuche haben wir constatirt, dass, wenn die methylalkoholische Lösung weniger als 1,5 % HCl enthält und kürzer als 5 Minuten erwärmt wird, dann ein Theil der beim Abkühlen sich ausscheidenden Krystalle in verdünnten Alkalien löslich ist. Beim längeren Erwärmen wird das Präparat zwar in Alkalien unlöslich, dafür wird aber der Kohlenstoff- und auch der Stickstoffgehalt merklich herabgesetzt und auch die Methylzahl ist vermindert. So wurden 10 g Acethämin in 800 ccm. Methylalkohol mit 10 g Chinin gelöst. Die filtrirte Lösung mit 70 ccm. HCl-haltigem Methylalkohol versetzt und zwar in dem Verhältniss, dass die Lösung 1,5 % freie HCl enthielt, und 10 Minuten lang auf dem Wasserbade zum Kochen erwärmt. Die beim Erkalten abgeschiedenen und abfiltrirten Krystalle wurden mit stufenweise verdünntem Methylalkohol, schliesslich mit salzsäurehaltigem Wasser gewaschen und anfangs auf Fliesspapier, sodann im Vacuum über SO_4H_2 und NaOH getrocknet. Die Krystalle waren in verdünnten Alkalien in der Kälte völlig unlöslich und ergaben bei den Analysen C 62,76 % und 63,06 %; H 5,63 % und 5,78 %; N 8,13 % und 8,32 %; Cl 5,69 % und 5,71 %; Fe 8,61 % und 8,71 %; und 3,93 % CH_3 .

In einem zweiten Versuche wurden 5 g nach dem Verfahren von Nencki und Sieber aus dem Amylalkohol erhaltenen Hämins in 400 g absoluten Methylalkohols mit 5 g Chinin gelöst und 300 ccm. der Lösung mit 20 ccm. mit HCl gesättigtem Methylalkohol 15 Minuten lang am Rückflusskühler auf dem Wasserbade gekocht. Die wie oben erhaltenen und gewaschenen Krystalle waren in wässerigen Alkalien völlig unlöslich. Bei den Elementaranalysen wurden folgende Zahlen

Cl 5,27% und 3,54% CH₃.

Da der Monoäthyläther des Acethämins in Alkalien leicht löslich ist und die beiden letzten Präparate darin völlig unlöslich waren, so konnte hier nicht ein Gemenge von Mono- und Dimethylhämin vorliegen. Vielmehr ist anzunehmen, dass nur der Dimethyläther vorlag, der aber zum geringen Theil durch zersetztes Hämin, in Folge des Kochens mit Salzsäure, verunreinigt war. Bei der mikroskopischen Betrachtung von Häminen, die länger mit salzsäurehaltigem Methylalkohol erwärmt wurden, sahen wir ausser der sternartig gruppirten Spindel auch kleine, dunkle Kugeln, an denen keine Krystallform mehr zu erkennen war.

Da, wie wir gleich sehen werden, das β -Hämin von Mörner der Monoäthyläther des Acethämins ist, so versuchten wir nach Mörner's Verfahren aus den rothen Blutkörperchen vom Rind mittelst Methylalkohol den Monomethyläther darzustellen. Der Versuch fiel insofern ungünstig aus, als die Blutkörperchen mit Methylalkohol gefällt, nach erfolgter Gerinnung vom Methylalkohol abgepresst, in feuchtem Zustande eine plastische Masse bilden, die, mit salzsäurehaltigem Methylalkohol erwärmt, nur wenig sehr kleine Krystalle gaben, die überdies durch Acidalbumin und Fett stark verunreinigt waren. Durch Kochsalzzusatz zu der Masse wurden zwar weniger verunreinigte, aber doch zur Analyse nicht geeignete Krystalle erhalten. Wurde der Blutkuchen an der Luft getrocknet und die fein gepulverte Masse mit salzsäurehaltigem Methylalkohol extrahirt, so ging nur wenig Farbstoff in Lösung und die Ausbeute an Krystallen war sehr gering.

Die Aethyläther des Acethämins.

Wird Acethämin in chininhaltigem Chloroform gelöst und die filtrirte Lösung nach der Vorschrift von Schälfejeff mit warmem, salzsäurehaltigem Aethylalkohol vermischt, so erhält man nach dem Erkalten neben den charakteristischen Formen des Acethämins auch spindelförmige, meistens sternförmig gruppirte Krystalle. In der üblichen Weise gereinigt und

destillirt, Aethylalkohol ab, welcher in den ersten Destillaten durch die Jodoform- oder die Aldehydreaction leicht nachgewiesen werden kann. Es entsteht also nach diesem Verfahren ein Gemisch von unverändertem Acethämin, seinem Aethyläther und wahrscheinlich auch Alkoholadditionsprodukte. Wird die salzsäurehaltige, äthylalkoholische Lösung auf dem Wasserbade länger erwärmt, so wird ein Theil der erhaltenen Krystalle in verdünntem Ammoniak unlöslich, indem, wie weiter unten gezeigt wird, der Diäthyläther des Acethämins sich bildet.

Das beste Verfahren zur Darstellung des Monoäthyläthers des Acethämins ist das von Mörner für das β -Hämin angegebene, denn nach unserer Ansicht ist das β -Hämin nichts Anderes als Monoäthylacethämin. Zu seiner Darstellung hat Mörner defibrirtes Blut mit einigen Volumen Wasser verdünnt und nach Zusatz der eben nöthigen Menge Schwefelsäure durch Kochen coagulirt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gut gewaschen und ausgepresst, dann mit Weingeist zerrieben und wieder ausgepresst. Er wurde darauf in Weingeist von 90—93% eingetragen (auf je 1 Liter verwendetes Blut etwa 1,5 Liter Weingeist), welcher mit 0,5—1 Volumprocent concentrirter Schwefelsäure versetzt worden war. Unter häufigem Umrühren wird das Pulver einige Stunden bei Zimmertemperatur mit dem sauren Weingeist in Berührung gelassen, wobei der Farbstoff fast vollständig ausgezogen wurde. Die ausgepresste und filtrirte weingeistige Lösung wird dann bis zu beginnendem Sieden erhitzt und mit erwärmter Salzsäure (auf je 1 Liter der Lösung 10 ccm. Salzsäure, welche mit Weingeist verdünnt wurde) versetzt und dann in der Kälte stehen gelassen. Die nach einem oder nach ein paar Tagen abgeschiedenen Krystalle wurden mit Weingeist, dann mit Wasser gewaschen, darauf in gelinder Wärme getrocknet und mit Petroläther und Aether erschöpft. In 6 Präparaten verschiedener Darstellung aus Hunde- und Rinderblut, denen noch 2 in der zweiten Abhandlung¹⁾ mitgetheilte hinzuzufügen

1) l. c. Festband Nr. 26, S. 5 und 8.

Zahlen, aus welchen er die Formel $C_{35}H_{35}O_4N_4ClFe$ berechnet. Der empirischen Zusammensetzung nach wäre dieses β -Hämin ein Homologes des Hämins von Nencki und Sieber, und zwar ein Propionylhämin $= C_{33}H_{30}(C_3H_5O)_3N_4ClFe$.

A priori ist es ja nicht ausgeschlossen, dass aus dem Hämoglobin ebensogut wie Acetylhämin auch Propionylhämin abgespalten werden kann. Uns ist es deshalb wahrscheinlicher, dass das β -Hämin der Monoäthyläther des Acethämins ist, weil Mörner selbst durch Destillation mit Natronlauge daraus Aethylalkohol abgespalten hat. Monoäthylacethämin $= C_{36}H_{37}O_4N_4ClFe$ kann bei der Verseifung höchstens 6,7% Aethylalkohol geben; zudem wissen wir vorläufig nicht, inwiefern durch Kochen mit Alkalien das Aethyl vollständig abgespalten wird. Wir wissen andererseits, mit welch' ausserordentlicher Leichtigkeit Hämin mit Alkoholen selbst durch 2—3%ige Mineralsäuren ätherificirt wird. Die von Mörner erhaltenen Zahlen stimmen ebensogut mit der Formel des Monoäthylacethämins wie mit der Formel des Propionylhämins überein.

	Propionylhämin $C_{33}H_{30}O_4N_4ClFe$	Monoäthylacethämin $C_{36}H_{37}O_4N_4ClFe$
Mörner fand im Mittel	verlangt	verlangt
C 63,26 %	C 63,03 %	C 63,49 %
H 5,24 »	H 5,25 »	H 5,44 »
N 8,31 »	N 8,40 »	N 8,23 »
Fe 8,36 »	Fe 8,40 »	Fe 8,23 »
Cl 5,20 »	Cl 5,30 »	Cl 5,21 »

Dass das β -Hämin in Alkalien leicht löslich ist, erklärt sich aus dem Umstande, dass im Monoäthyläther noch ein Hydroxyl frei ist. Mörner hat auch den in Alkalien unlöslichen Diäthyläther des Acethämins, wenn auch in weniger reinem Zustande, dargestellt. Er betont ausdrücklich, dass zur Darstellung des β -Hämins das Blutpulver bei Zimmertemperatur mit dem sauren Weingeist digerirt werden muss. Bei längerem Erwärmen der sauren Lösung wurden nicht Nadeln und Blättchen des β -Hämins, sondern fast durchgehend würfelförmige, weniger gut entwickelte Krystalle erhalten.

fast kugelförmig aussehen. Diese Krystalle sind nicht braunviolett, sondern schwarz und in Alkalien unlöslich — «auch nach längerem Erwärmen wurde das Ammoniak nicht einmal gefärbt.»¹⁾ — Wir können aus eigenen Erfahrungen in allen Stücken die Angaben dieses exacten Forschers bestätigen. Eine gute Abbildung dieser kugel- und würfelförmigen Krystalle, mit Spindeln und Blättchen vermengt, hat Cloetta²⁾ dessen «nicht umkrystallisiertes salzsaures Hämin», jedenfalls zum grossen Theil aus einem Gemische des Mono- und Diäthyläthers bestand, gegeben. Elementaranalysen dieser in Alkalien unlöslichen Krystalle ergaben nach Mörner für 3 verschiedene Präparate folgende Zahlen:

Der Kohlenstoff gleich resp. 63,96 % — 64,77 % — 64,30 %; der Wasserstoff gleich 6,00 %; der Stickstoff gleich resp. 7,95 % — 7,70 % — 7,78 %; das Eisen gleich resp. 7,87 % — 7,85 % — 7,97; das Chlor gleich resp. 5,46 % — 4,99 % — 5,21 %. Die Formel $C_{34}H_{31}(C_2H_5)_2O_4N_4ClFe$ Aeq. 708,5 verlangt: C 64,36 %; H 5,78 %; N und Fe 7,90 % und 5,01 % Cl.

Bei unseren vielfach variirten Versuchen, um den Diäthyläther des Acethämins rein zu bekommen, hatten wir mancherlei Schwierigkeiten zu überwinden. Die Bildung des Aethyläthers geht nicht so leicht wie die des Methyläthers vor sich und musste die Salzsäure etwas concentrirter, etwa 3 %, angewendet werden. Zur Auflösung des Acethämins ist chininhaltiger absoluter Alkohol nicht geeignet, da darin die Krystalle nur sehr wenig löslich sind. Am zweckmässigsten fanden wir, die Krystalle in chininhaltigem Chloroform zu lösen und die filtrirte Lösung mit kochendem, salzsäurehaltigem Alkohol zu vermischen. Der Alkohol muss wasserhaltig, etwa 90 %, sein, da sonst beim Erkalten wenig oder gar keine Krystalle sich bilden. Verdünnterer Alkohol ist zu vermeiden, weil sich dann das Chloroform ausscheiden würde. Wird nach dem Vermischen der beiden Lösungen die Flüssigkeit länger erwärmt, so werden nur sehr kleine, sternförmig gruppirte

1) Mörner l. c. S. 13.

2) Cloetta l. c. S. 352.

des Hämins erhalten. 4 g dieser Krystalle und 6 g Chinin wurden in einem Gemische von 100 ccm. absoluten Alkohols und 100 ccm. Chloroform in der Kälte gelöst. 150 ccm. der filtrirten Lösung wurden mit 850 ccm. absoluten Alkohols, 85 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 und 20 ccm. Wasser 5 Minuten lang im Sieden erhalten und hierauf erkalten gelassen. Die Krystalle waren nicht so schön und homogen, wie in den beiden vorigen Präparaten; neben den sternförmig gruppirten Nadeln waren auch vereinzelte Würfel vorhanden; in wässrigem Ammoniak waren sie ganz unlöslich, leicht und vollständig löslich in Chloroform.

0,2973 g gaben 0,1586 g H_2O u. 0,7011 g CO_2 = 5,93 % H u. 64,31 % C
 0,2232 „ „ 15,4 ccm. N-Gas bei 18,5° T. u. 764 mm. Bst. = 8,02 % N
 0,5822 „ „ 0,1173 g AgCl u. 0,0680 Fe_2O_3 = 4,98 % Cl u. 8,18 % N
 0,2571 „ „ bei der Aethylbestimmung 0,1731 g AgJ = 8,31 % C_2H_5 .

Wir stellen in Folgendem die erhaltenen Zahlen übersichtlich zusammen.

Es wurden gefunden:				Die Formel: $C_{64}H_{81}(C_2H_5)_2O_4N_4ClFe$	
	1.	2.	3.	verlangt:	
C	64,18 %	64,21 %	64,31 %	C	64,36 %
H	5,65 „	5,85 „	5,93 „	H	5,78 „
N	7,94 „	7,93 „	8,02 „	N	7,90 „
Fe	8,13 „	—	8,18 „	Fe	7,90 „
Cl	5,30 „	—	4,98 „	Cl	5,01 „
C_2H_5	7,19 „	7,93 „	8,31 „	$(C_2H_5)_2$	8,28 „

Wir haben absichtlich den modus procedendi bei diesen 3 Präparaten detaillirt angegeben, denn jede nur geringe Aenderung in der Concentration der Lösung, Gehalt an Säure, Dauer des Erwärms beeinflusst gleich die Reinheit des Präparates. Wie aus der Zusammenstellung ersichtlich, war das zweite Präparat das reinste, wenn auch hier die Ausbeute nur gering war. Bei einer zweiten Darstellung des Diäthyläthers aus dem nach der Vorschrift von Nencki und Sieber mittelst Amylalkohol dargestellten Hämins, wo das Erwärmen mit Säure nur einige Minuten länger dauerte, erhielten wir schon ein anders zusammengesetztes Produkt. Es wurden in diesem Versuche 3 g Hämin und 4,5 g Chinin in einem Ge-

Kälte gelöst und 125 ccm. des Filtrats mit 700 ccm. absoluten Alkohols und 70 ccm. Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,19) 8 Minuten lang auf dem warmen Wasserbade gehalten. Beim Erkalten wurden nur etwa zur Hälfte sehr kleine zu Rosetten vereinigte Nadeln erhalten, die andere Hälfte bestand aus den würfel- und kugelförmigen Gebilden. Dieses Präparat, wie die vorigen gewaschen und getrocknet, war in Alkalien unlöslich und ergab bei den Analysen folgende Zahlen:

0,2588 g gaben 0,1371 g H_2O u. 0,6117 g CO_2 = 5,89 % H u. 64,45 % C
 0,2545 „ „ 17,8 ccm. N-Gas bei 19,5° T. u. 755 mm. Bst. = 8,00 % N
 0,2422 „ „ gaben im Zeissel'schen Apparate mit JH erhitzt 0,2105 g
 AgJ = 10,73 % C_2H_5 .

Bei der Darstellung des Diäthyläthers aus dem nach dem Verfahren von Nencki und Sieber bereiteten Hämin konnte man annehmen, dass hier ein Gemenge des Diäthyläthers des Acethämins und des Hämins von der Formel: $C_{32}H_{51}O_3N_4ClFe$ welche verlangt: C 64,81 %; H 5,85 %; N und Fe 8,40 %; 5,32 % Cl und 8,70 % C_2H_5 . Auch die oben citirte Analyse Nr. 3 zeigt den höchsten Aethylgehalt. Der Umstand, dass das zuletzt analysirte Präparat etwa zur Hälfte aus den würfel- und kugelförmigen Gebilden bestand und dabei 10,73 % Aethyl enthält, spricht aber dafür, dass hier eine tiefere Veränderung im Molekül stattgefunden hat.

Der Monoamyläther des Acethämins.

Von besonderem Interesse war für uns die Darstellung des Amyläthers des Hämins, da das nach der Vorschrift von Nencki und Sieber bereitete Hämin Amylalkohol enthält. Zunächst haben wir aus dem gewöhnlichen Gährungsamylalkohol, der also vorwiegend aus Isobulytcarbinol besteht, das Jodid dargestellt und uns überzeugt, dass dieses Jodid bei der Destillation mit den Wasserdämpfen sich vollkommen verflüchtigt, dass also bei der Spaltung der Aether mit JH in dem Zeissel'schen Apparate der Amylgehalt bestimmt werden kann. Wir fanden aber in einem nach der Vorschrift von Nencki und Sieber bereiteten und im Vacuum getrockneten Hämin aus

Unter der Voraussetzung, dass alles Amyl als Jodid sich verflüchtigte, berechnet sich die Menge des zu erwartenden C_5H_{11} nach der Formel: $(C_{32}H_{51}O_3N_4ClFe)_4C_5H_{11}O$ zu 2,8% C_5H_{11} .

Wir versuchten sodann auf ähnliche Weise, wie wir den Methyl- und Aethyläther bereitet, auch den Amyläther darzustellen. Hämin, in chininhaltigem Chloroform gelöst, gibt mit auf 100° erwärmtem, salzsäurehaltigem Gährungsamylalkohol beim Erkalten keine Krystalle, offenbar weil der entstandene Aether darin leicht löslich ist. Nach verschiedenen Versuchen sind wir dabei stehen geblieben, Hämin in chininhaltigem Amylalkohol, der 4—5% Wasser enthält, aufzulösen und die warme, filtrirte Lösung mit Salzsäure zu versetzen. Zur Auflösung sind auf 1 g Hämin etwa 200 ccm. solchen Amylalkohols nothwendig. Nach mehrstündigem Stehen und häufigem Umrühren oder noch besser bei Erwärmen auf 40—60° löst sich der grösste Theil der Krystalle darin auf; immerhin bleibt viel mehr ungelöstes Hämin als wie bei der Bereitung des Methyl- oder des Aethyläthers zurück. Von wesentlicher Bedeutung für die Entstehung der Krystalle beim Erkalten ist die Menge der zugesetzten Salzsäure. Wurde zu der filtrirten amylalkoholischen Lösung so viel HCl zugesetzt, dass die Flüssigkeit 2—1% HCl enthielt, so entstand sofort ein amorpher, schwarzer Niederschlag, der in Chloroform sehr leicht löslich war und welchen wahrscheinlich schon Bialobrzewski in den Händen hatte und analysirte.¹⁾ Erst bei einer zehnfach geringeren Menge von Chlorwasserstoff, also wenn die Lösung nur 2—1 pro mille HCl enthielt, haben wir gut ausgebildete Krystalle erhalten. In einem Versuche, wobei wir Acethämin verwendeten und die Lösung 1‰ HCl enthielt, war der auskrystallisirte Aether noch mit unverändertem Acethämin vermischt. In einem zweiten Versuche, wo wir vom Hämin nach Nencki und Sieber ausgegangen sind und der Lösung 2‰ HCl zusetzten, erhielten wir ein ganz homogenes Präparat. Das Verfahren war folgendes:

1) Ber. der deutsch. chem. Gesellsch. Jahrgang 1896. 2850.

wurden mit 1 Liter Amylalkohol Anfangs bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln stehen gelassen und hierauf noch $1\frac{1}{2}$ Stunden auf 50° auf dem Wasserbade erwärmt. Trotzdem blieb viel von den Krystallen ungelöst zurück. 0,5 Liter der filtrirten Lösung wurde nunmehr auf 98° erwärmt, mit 2 ccm. Salzsäure specifisches Gewicht 1,124 ($0,1\%$ entsprechend) versetzt und langsam erkalten gelassen. Wir erhielten eine reichliche Krystallisation, hauptsächlich aus wohlausgebildeten, sechseitigen Tafeln bestehend, daneben waren auch, wenn nur spärlich, Krystalle des unveränderten Acethämins vorhanden. Nach 24 Stunden wurde decantirt, der krystallinische Bodensatz mit 90% igem Aethylalkohol übergossen, auf ein Filter gebracht, stufenweise mit verdünnterem Alkohol, dann mit Wasser und zum Schluss noch mit 80% igem Alkohol gewaschen. Der Waschalkohol und das Wasser enthielten 1% HCl. Die in vacuo getrockneten Krystalle verloren bei 100° $0,3\%$ an Gewicht. Bei der Elementaranalyse dieses Präparates erhielten wir folgende Zahlen:

0,2283 g nur im vacuo getrocknet gaben $0,1193$ g H_2O u. $0,5296$ g CO_2 = $5,81\%$ H u. $63,27\%$ C.

$0,2390$ g gaben $17,4$ ccm. N-Gas bei $15,6^{\circ}$ T. u. 752 mm. Bst. = $8,44\%$ N.

Nach dem Trocknen bei 100°

$0,2754$ g gaben $0,1373$ g H_2O u. $0,6404$ g CO_2 = $5,54\%$ H u. $63,45\%$ C.

$0,4599$ „ „ $0,0973$ g AgCl u. $0,0538$ Fe_2O_3 = $5,23\%$ Cl u. $8,19\%$ Fe.

$0,2613$ „ „ $0,0328$ g AgJ = $3,79\%$ C_8H_{11} .

2. 10 g Hämin, nach dem Verfahren von Nencki und Sieber dargestellt, 15 g Chinin, 80 ccm. Wasser und 2 Liter Amylalkohol wurden eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. 1 Liter der filtrirten Lösung wurde sodann auf 98° erhitzt und mit 8 ccm. Salzsäure (spec. Gew. $1,174$) versetzt (Säuregehalt der Lösung = $0,2\%$). Beim Erkalten schieden sich ganz feine spindelförmige Nadeln ab, frei von jeder anderen Krystallform. Das Präparat, wie das vorige gewaschen und nur im Vacuum getrocknet, ergab bei den Analysen folgende Zahlen:

$0,2887$ g gaben $0,1631$ g H_2O u. $0,6875$ g CO_2 = $6,26\%$ H u. $64,74\%$ C.

$0,2857$ „ „ $0,1567$ g H_2O u. $0,6779$ g CO_2 = $6,09\%$ H u. $64,71\%$ C.

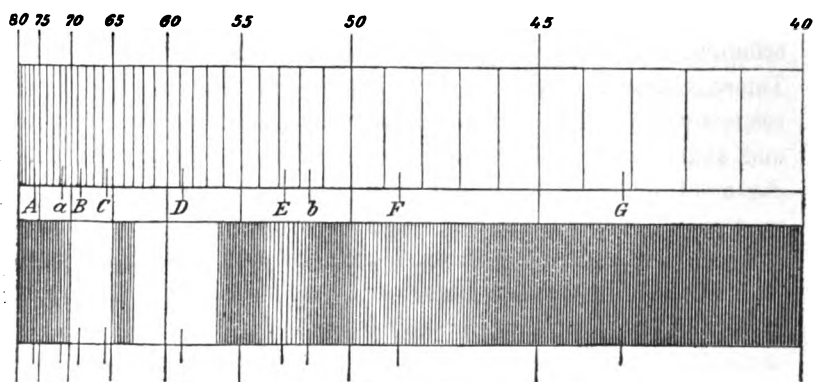
0,2169 „ „ 15,0 ccm. N-Gas bei 17,1° T. u. 760 mm. Bst. = 7,95% N.
 0,5524 „ „ 0,1069 g AgCl u. 0,0628 g Fe₂O₃ = 4,79% Cl u. 7,96% Fe.
 0,6049 „ „ 0,1176 g AgCl u. 0,0689 g Fe₂O₃ = 4,81% Cl u. 7,98% Fe.
 0,3457 „ „ 0,1026 g AgJ = 8,97% C₅H₁₁.
 0,2132 „ „ 0,0589 g AgJ = 8,35% C₅H₁₁.

Dieser Aether war wie die anderen Häminäther in Chloroform leicht löslich, weniger in Methyl-, Aethyl- und Amylalkohol. In wässrigem Ammoniak ist er nur sehr wenig löslich. Im Capillarröhrchen über 350° erhitzt, schmilzt er nicht. Sein Spectrum und die Krystallform wird auf den beigegebenen Tafeln abgebildet. Wie aus der Zusammenstellung ersichtlich, entspricht seine Zusammensetzung scharf der Formel eines Monoamyläthers des Acethämins. Vergleichshalber geben wir noch die procentische Zusammensetzung eines Monoamyläthers des Hämins.

Berechnet für	Berechnet für	Gefunden :
C ₃₂ H ₅₀ (C ₅ H ₁₁) ₄ N ₄ FeO ₄ Cl	C ₃₄ H ₅₈ (C ₅ H ₁₁) ₄ N ₄ FeO ₄ Cl	
C 65,24%	C 64,77%	C 64,74 und 64,71%
H 6,02%	H 5,95%	H 6,26 „ 6,09%
N 8,22%	N 7,75%	N 7,63 „ 7,95%
Fe 8,22%	Fe 7,75%	Fe 7,96 „ 7,98%
Cl 5,21%	Cl 4,91%	Cl 4,79 „ 4,81%
C ₅ H ₁₁ 10,43%	C ₅ H ₁₁ 9,82%	C ₅ H ₁₁ 8,97 „ 8,35%

Oben wurde erwähnt, dass nach Zusatz von 1 % HCl zu der warmen, amylalkoholischen Lösung des Acethämins ausser dem unveränderten Acethämin noch grössere, sechsseitige Tafeln erhalten wurden. Die gleichen tafelförmigen Krystalle, nur etwas kleiner, erhielten wir auch in wechselnder Menge bei der Darstellung der Aether aus Methyl- und Aethylalkohol. Sie sind in Alkalien leicht löslich und gaben bei der Alkylbestimmung meistens nur 10—30% der theoretisch erwarteten Menge. Vollkommen homogen konnten wir sie nie erhalten. Meistens waren sie vermengt mit kleineren wetzstein- und spindelartigen Formen, die, wie die krystallographische Bestimmung zeigte, dem gleichen System angehören. Da das Hämin durch die Eigenschaft, mit allen möglichen Substanzen zu krystallisiren, ausgezeichnet ist, so ist es uns am wahrscheinlichsten, dass diese relativ grossen, sechsseitigen

verdünnt. Die Spectra aller von uns analysirten Aether und des Hämins aus Aceton waren mit dem Spectrum des Acet-
hämins identisch. Die Lösungen, passend verdünnt, zeigen
drei Absorptionsstreifen, deren respective Wellenlänge wir zu
 $\lambda = 647-630$; $\lambda = 561-538$ und $\lambda = 518-500$ bestimmt
haben.



Das Hämin aus Aceton und aus Essigäther.

Aus dem bisher Mitgetheilten geht hervor, dass nach der von Schalfejeff verbesserten Methode Teichmann's durch Extraction des Blutes mit Eisessig nicht ein Hämin von der Formel $C_{33}H_{31}O_3N_4ClFe$, sondern ein um die Acetylgruppe reicheres Hämin von der Formel $C_{34}H_{33}O_4N_4ClFe$ erhalten wird. Dieses Hämin enthält zwei Hydroxylgruppen, was durch den von uns dargestellten Diäthyläther und den Monoamyläther bewiesen ist. Da ferner aus dem nach der Vorschrift von Nencki und Sieber dargestellten Hämin der Monoamyläther des Acethämins erhalten wurde, so spricht dieser Befund dafür, dass in dem mittelst Amylalkohol und Salzsäure dargestellten Präparate das Acethämin vielleicht im Gemisch mit dem Hämin von der Formel $C_{33}H_{31}O_3N_4ClFe$ enthalten sein muss. Ueberhaupt spricht die Gesammtheit der jetzt erhaltenen Resultate mehr dafür, dass dem durch Abspaltung aus dem

$C_{34}H_{33}O_4N_4ClFe$ $C_{33}H_{31}O_4N_4ClFe$ $C_{32}H_{29}O_4N_4ClFe$

C 62,55%

C 62,88%

C 62,66%

H 5,06%

H 5,08%

H 5,53%

N 8,58%

N 9,17%

N 8,95 u. 8,87%

Fe 8,58%

Fe 9,17%

Fe 9,33 u. 8,93%

Cl 5,44%

Cl 5,81%

Cl 5,60 u. 5,68%

Wir haben reines analysirtes Acethämin noch 2 mal auf gleiche Weise umkrystallisirt. Das umkrystallisirte Präparat ergab folgende Zahlen:

0,2498 g gaben 0,5718 g CO_2 u. 0,1162 g H_2O = 62,41% C u. 5,17% H.

0,2577 g „ 19,6 ccm. N-Gas bei 24,2° T. u. 756 mm. Bst. = 8,53% N.

0,5465 g „ 0,1254 g $AgCl$ u. 0,0678 g Fe_2O_3 = 5,67% Cl u. 8,68% Fe,

also Zahlen, welche genau mit der Formel $C_{34}H_{33}O_4N_4ClFe$ übereinstimmen. Bei der ausserordentlichen Reactionsfähigkeit und Veränderlichkeit des farbigen Bestandtheils des Häoglobins müssen feine, bis jetzt uns unbekannte Momente bestimmend sein, von welchen die Zusammensetzung des abgespaltenen Hämins abhängig ist.

Da bei der Extraction der Hämoglobine mit Alkoholen und Mineralsäuren stets Alkyläther oder Alkoholadditionsprodukte sich bilden, so war es wünschenswerth, zu erfahren, was für Hämin entstehen wird, wenn statt eines Alkohols eine mehr indifferente Substanz zur Darstellung dieses Farbstoffs angewendet wird. Wir wählten zu diesem Zwecke das Aceton. Wir verwendeten anfangs für die orientirenden Versuche reines Aceton aus der Bisulfitverbindung. Später, als sich herausstellte, dass auch aus dem Aceton von Kahlbaum Sdp. 56—57° dasselbe Produkt erhalten wird, verwendeten wir bei der Darstellung des Hämins im Grossen nur die letztere billigere Sorte.

Werden frisch isolirte rothe Blutkörperchen mit Aceton und wässeriger Salzsäure auf dem Wasserbade erwärmt, so nimmt alsbald die Mischung eine braunrothe Farbe an und der Farbstoff geht fast vollständig in die Lösung über. Beim Erkalten scheidet sich das Hämin in den für das Acetonhämin äusserst charakteristischen langen, gebogenen, haarförmigen Krystallen aus. Bei langsamem Erkalten werden auch dickere Krystalle erhalten; lässt man aber einen Tropfen der Lösung

Trocknen von neuem aus Aceton umkrystallisirt. Diese zweite Krystallisation bewerkstelligten wir auf folgende Weise: 8 g dieses Hämins und 8 g Chinin wurden mit 1200 ccm. 80%igen Acetons übergossen, tüchtig umgeschüttelt und gelinde, jedoch nicht bis zum Kochen, auf dem Wasserbade erwärmt. — (In absolutem Aceton ist dieses Hämin sehr wenig löslich, leichter in wässrigem und zwar am besten, wenn die Lösung auf 4—5 Theile Aceton 1 Theil Wasser enthält.) — Ein Theil der Krystalle blieb ungelöst zurück, wovon abfiltrirt wurde. Das Filtrat wurde hierauf mit 16 ccm. Salzsäure, spezifisches Gewicht 1,124, versetzt und 3 Minuten lang auf dem Wasserbade zum Kochen erhitzt. Am folgenden Tage wurden die abgeschiedenen Krystalle abfiltrirt, mit stufenweise verdünntem Aceton, zuletzt mit saurem Wasser (1% HCl) gewaschen und in vacuo sodann bei 100° bis zu constantem Gewichte getrocknet. Die Elementaranalyse dieses in wässrigen Alkalien leicht löslichen Präparates ergab Zahlen, die am nächsten der Formel des Hämins $C_{32}H_{51}O_3N_4ClFe$ stehen — gef. C 62,63%; H 5,38%; N 8,75%; Cl 5,30%; Fe 9,06%; — leider waren die Krystalle nicht homogen. Nach der Untersuchung des Herrn Prof. Zemiatschensky besteht die Hauptmenge der Krystalle aus den haarförmigen gebogenen Nadeln mit schiefer Auslöschungswinkel, der an den kürzeren und geraden gemessen 40—43° beträgt. Daneben sind auch kürzere und mehr breite Blättchen, deren Auslöschungswinkel 27—31° beträgt, und in ganz geringer Menge spindelförmige Krystalle mit gerader Auslöschung vorhanden. 2 g des analysirten, bei 100° getrockneten Präparates, mit verdünnter Schwefelsäure destillirt, gaben in den ersten Portionen des Destillates eine schwache Jodoformreaction, so dass die Krystalle eine minimale Menge von Aceton enthalten dürften. Die Menge des erhaltenen Jodoforms war so gering, dass an eine quantitative Bestimmung des Acetons nicht zu denken war. Im Zeissel'schen Apparate mit JH auf 145° erhitzt, gab dieses Präparat in der Silberlösung kaum eine Trübung.

Für das Verständniss der wahren Zusammensetzung der haarförmigen Krystalle ist die Thatsache von Bedeutung, dass

braucht nur die haarförmigen Krystalle in ammoniakalischem Alkohol oder chininhaltigem Chloroform aufzulösen und die filtrirte Lösung in den bei Acethämin angegebenen Verhältnissen mit heissem, kochsalzhaltigem Eisessig zu vermischen, um die typischen triklinischen Tafeln von der Zusammensetzung des Acethämins zu erhalten. Umgekehrt lässt sich auch das Acethämin in die charakteristischen haarförmigen Krystalle aus Aceton überführen. Reines Acethämin wurde genau wie das vorhin beschriebene Präparat in chininhaltigem 80%igen Aceton gelöst, zu der filtrirten Lösung in dem gleichen Verhältnisse wie oben Salzsäure zugesetzt und drei Minuten lang auf dem Wasserbade zum Kochen erhitzt. Die nach zweitägigem Stehen abgeschiedenen Krystalle waren auch jetzt nicht homogen. Ausser den haarförmigen Krystallen, die die Hauptmasse bildeten, war etwas Acethämin vorhanden. Auch diese Krystalle, wie die vorigen gewaschen und getrocknet, ergaben bei den Verbrennungen Zahlen, welche am nächsten der Formel: $C_{33}H_{31}O_3N_4ClFe$ entsprechen. Gef. C 62,32%; H 5,24%; N 8,75%; Fe 8,86%; Cl 5,78 und 5,81%.

Bemerkenswerth ist es, dass alle die von uns dargestellten Aether, sowie das Hämin aus Amylalkohol nach Nencki und Sieber auf gleiche Weise wie das Acethämin mit Aceton behandelt, keine Krystalle geben. Im günstigsten Falle erhält man daraus sehr kleine spindelförmige Krystalle mit gerader Auslöschung, der grösste Theil des abgeschiedenen Hämins ist aber amorph.

Werden die haarförmigen Krystalle längere Zeit mit chininhaltigem Aceton in der Wärme digerirt, so bleibt auch nach langem Kochen und Zusatz von mehr Aceton ein Theil der Krystalle ungelöst zurück. Die filtrirte Lösung gibt nach Salzsäurezusatz meistens dicke gerade Krystalle, jedoch von keiner constanten Zusammensetzung und erheblich niedrigerem Gehalte an Stickstoff, Eisen und Chlor. Gef. C 63,17%; H 5,39%; N 8,21 und 8,27%; Fe 8,33 und 8,14%; Cl 4,52 und 4,45%, so dass hier theilweise Aetherbildung, theilweise auch Zersetzung wohl stattgefunden hat.

auch versucht, aus den Blutkörperchen mit Essigäther das Hämin zu extrahiren. Der durch Senkung erhaltene Blutkörperchenbrei, mit Essigäther versetzt, coagulirt schlecht, so dass ziemlich viel des Farbstoffes in der Flüssigkeit hinterbleibt. Das erhaltene Hämoglobincoagulum ist in reinem Essigäther nur in Spuren löslich; wird aber dem Essigäther Salzsäure zugesetzt und die Flüssigkeit erwärmt, so geht viel Farbstoff in Lösung, die sich jetzt braunroth färbt. Wir verwendeten auf 400 g des Blutcoagulums 4 Liter Essigäther und 100 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19. Leider, wie man sich denken konnte, wird durch die Salzsäure der Essigäther gespalten und wir durften nur ein Gemenge von Acethämin und dessen Aethyläther erwarten. Thatsächlich schieden sich auch beim langsamen Verdunsten der warm filtrirten Lösung anfangs überwiegend sechsseitige Tafeln mit gerader Auslöschung aus. Bei weiterer Krystallisation waren die typischen triklinischen Täfelchen mit dem Auslöschungswinkel von $33-35^\circ$ des Acethämins zahlreich vorhanden. Wir verzichteten deshalb auf weitere Analysen dieses nicht homogenen Productes.

Obleich schon Bialobrzski¹⁾ aus dem nach Schalfjeff mittelst Eisessig erhaltenen Hämin sowohl Hämatin von der Zusammensetzung $C_{33}H_{32}O_4N_4Fe$ als auch das salzsaure Hämatoporphyrin $= C_{16}H_{18}O_3N_2HCl$ in reinem Zustande dargestellt und analysirt hat, so war es uns doch wünschenswerth, nachdem wir gefunden haben, dass durch BrH in Eisessig schon in der Kälte Hämatoporphyrin entsteht, nachzuprüfen, ob das in der Kälte aus Acethämin bereitete Hämatoporphyrin die Zusammensetzung: $C_{16}H_{18}O_3N_2$ habe. Es war denkbar, dass in der Kälte aus dem Acethämin durch Bromwasserstoff nach einer der zwei folgenden Gleichungen das Eisen abgespalten wird:

1. $C_{34}H_{33}O_4N_4ClFe + (BrH)_2 + 2H_2O = C_{34}H_{33}N_4O_6 + FeBr_2 + HCl$
oder auch

2. $C_{34}H_{33}O_4N_4ClFe + (BrH)_2 + 2H_2O = C_{34}H_{33}N_4O_6 + FeBr_2 + HCl + H_2$.

Den Hauptunterschied in ihrer Zusammensetzung im Vergleich zu der Zusammensetzung des Hämatoporphyrins =

1) Ber. d. deutschen chem. Ges., 1898, S. 2848.

$C_{16}H_{18}N_2O_3$ zeigen die beiden obigen Formeln in ihrem Kohlenstoffgehalte. Das Hämatoporphyrin $C_{16}H_{18}N_2O_3$ enthält: 67,13% C, 6,29% H und 9,79% N. Die Formel: $C_{34}H_{38}N_4O_6$ verlangt: 68,23% C, 6,35% H und 9,36% N und die um zwei Wasserstoffe ärmere = $C_{34}H_{36}N_4O_6$ verlangt: 68,45% C, 6,04% H und 9,39% N.

Wir haben 10 g reines Acethämin und 150 ccm. mit BrH gesättigten Eisessig 3 Tage lang unter häufigem Umrühren bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am 4. Tage wurde die schön rothe Lösung in Wasser gegossen und, wie in der nachfolgenden Mittheilung beschrieben, verarbeitet. Das erhaltene salzsaure Hämatoporphyrin wurde noch einmal aus wässeriger Salzsäure umkrystallisirt und das jetzt unter dem Mikroskope aus vollkommen homogenen Nadeln bestehende Salz, nachdem es von der Mutterlauge abfiltrirt, mit verdünnter HCl nachgewaschen und zwischen Fliesspapier abgepresst war, von Neuem in Wasser gelöst und durch die nöthige Menge Natriumacetat in das freie Hämatoporphyrin verwandelt. Dieses Präparat vollkommen aschefrei mit Wasser gewaschen, in vacuo bis zu constantem Gewichte getrocknet, wog 1,93 g und ergab bei der Verbrennung 67,21% C, 6,39% H und 9,64% N, also Zahlen, welche gut mit der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ übereinstimmen.

Ein zu gleicher Zeit durch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade nach 24stündigem Stehen mit Bromwasserstoff aus dem Hämin nach Nencki und Sieber, sonst aber auf gleiche Weise bereitetes Hämatoporphyrin ergab bei der Verbrennung 67,08% C, 6,24% H und 9,62% N.

Auf Grund der nunmehr aufgefundenen Thatsachen können die meisten Widersprüche in den Angaben über das Hämin und Hämatin aufgeklärt werden.

Aus dem Hämoglobin wird durch Eisessig nach dem ursprünglich von Teichmann angegebenen, später von verschiedenen anderen Autoren und zuletzt von Schälfejeff verbesserten Verfahren das Acethämin abgespalten. Höchst wahrscheinlich ist in diesem Körper sowohl das Chlor, wie das Acetyl an das Eisen gebunden, denn sobald das letztere mittelst Bromwasserstoff aus dem Molekül des Acethämins

gespalten. Beim Verseifen des Acethämins mittelst kalter Natronlauge bleibt noch das Eisen im Molekül, das Chlor und Acetyl aber werden abgespalten. Die Verseifung ist aber nicht eine vollkommene, da das Hämatin noch immer minimale Mengen von Chlor enthält und auch die Zahlen für C, N und Fe in einigen Analysen etwas niedriger als die theoretischen Werthe ausfallen (vgl. Bialobrzewski l. c. S. 2848). Auch aus dem aus dem Amylalkohol nach der Vorschrift von Nencki und Sieber dargestellten Hämin, in welchem mehrere Moleküle des Hämins durch ein Molekül Amylalkohol zusammengehalten werden, wird bei der Verseifung mit Natronlauge das Hämatin von der Zusammensetzung $C_{32}H_{33}O_4N_4Fe$ erhalten.

Allem Anscheine nach sind die haarförmigen mittelst Aceton erhaltenen Krystalle mit dem Auslöschungswinkel von $40-43^\circ$ das freie Hämin von der Formel $C_{32}H_{31}O_3N_4ClFe$, obgleich bei der ausserordentlichen Neigung dieses Farbstoffs, sich mit anderen Substanzen zu verbinden, auch mittelst Aceton kein absolut reines Produkt erhalten wurde. Dass aus dem Aether des Hämins resp. Acethämins, in welchen nur ein Hydroxylwasserstoff durch Alkyl ersetzt ist, beim Verseifen durch Alkalien in der Kälte freies Hämatin entstehen werde, ist bei der relativen Beständigkeit der Aether kaum zu erwarten; eher ist es wahrscheinlich, dass z. B. aus dem Monoäthylacethämin ein Aethylhämatin erhalten werden wird. Erwärmen mit Alkaliläugen hat die Gefahr, dass auch das Eisen aus dem Molekül herausgelöst werden kann. Der Dimethyl- und der Diäthyläther des Hämins, die erst beim Kochen mit Natronlauge in Lösung übergehen, dürften schwerlich dabei ein einheitliches Produkt liefern.

In Anbetracht der durch diese Untersuchungen erweiterten Kenntnisse des Hämins halten wir es nochmals für angezeigt, die Angaben von H. Bertin-Sans und J. Moitessier¹⁾ sowie die von Preyer²⁾ über die Synthese des Hämoglobins aus Hämatin und Eiweiss als wenig wahrscheinlich zu bezeichnen.

1) Bull. soc. chim., Paris 5 mai 1893.

2) Ber. d. chem. Ges., Berlin 1897, S. 191.

Hämoglobin, aus welchem er die Synthese bewerkstelligt haben will, überhaupt zerstört war.

Schon vor längerer Zeit wurde im Laboratorium des Einen von uns noch in Bern durch Herrn M. Lebensbaum¹⁾ gezeigt, dass bei der Spaltung des Hämoglobins in Eiweiss und Hämatin Sauerstoff und Wasser aufgenommen werden, resp. zum Zustandekommen dieser Reaction nothwendig sind. Bei der Synthese des Hämoglobins müsste also der umgekehrte Process, d. h. Abspaltung von Wasser und Sauerstoffentziehung stattfinden, Reactionen, die schwerlich durch Zusammenmischen von Hämatin mit Eiweiss realisirt werden. Bei der Aehnlichkeit des Spectrums des Oxyhämoglobins mit den Spectren der Farbstoffe aus der Hämatin-Gruppe ist hier Vorsicht geboten und spectroscopische Befunde allein nicht entscheidend. So liegen z. B., wie uns vergleichende Versuche gezeigt haben, die beiden Absorptionsstreifen des kürzlich von Arnold²⁾ als Hämatin in neutraler Lösung beschriebenen Farbstoffs zwischen den am meisten nach Violett zu verschobenen zwei Streifen des Hämochromogens und der am meisten nach Roth zu liegenden beiden Streifen des Oxyhämoglobins. Der Hauptunterschied zwischen dem Arnold'schen Farbstoff und dem Oxyhämoglobin ist, dass beim letzteren der nach Roth zu liegende Streifen stark Licht absorbirt und scharf begrenzt ist, während bei dem Arnold'schen Farbstoff das Umgekehrte der Fall ist. Das sicherste Kriterium, nämlich die Darstellung künstlicher Oxyhämoglobinkrystalle, bleibt noch aus. Wir wollen keineswegs behaupten, dass die Hämoglobinsynthese eine Sache ferner Zukunft sei, glauben aber, dass es noch weiterer Untersuchungen namentlich über das Hämochromogen bedarf, das nach den interessanten Versuchen des Herrn v. Zeynek³⁾ ein nicht allzuschwer zugänglicher Körper ist, um Mittel und Wege zur Hämoglobinsynthese zu finden.

1) Wiener Monatshefte für Chemie, Bd. 8, S. 165—179.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, S. 79.

3) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 492.





Fig. I



Fig. II

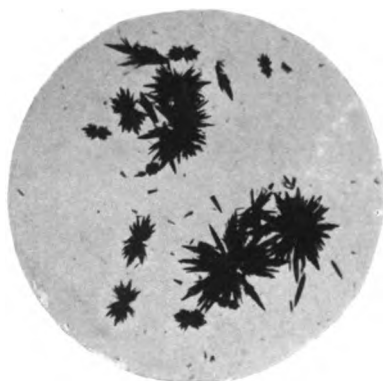


Fig. III

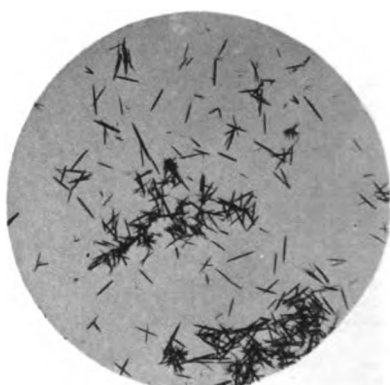


Fig. IV

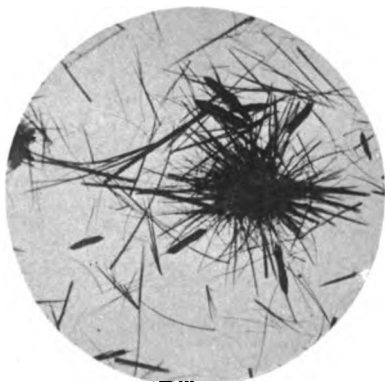


Fig. V

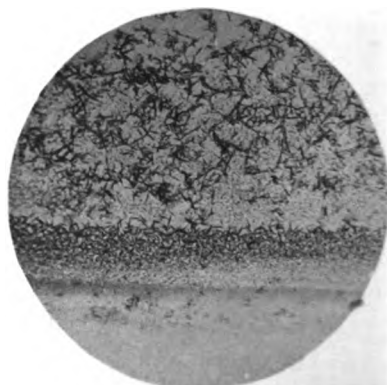


Fig. VI

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band XXX.
Zu „Nencki und Zaleski, Untersuchungen über den Blutfarbstoff.“

Verlag von Karl J. Trübner,
Strassburg.

Figur I. Acethämin aus Eisessig umkrystallisirt.

- II. Sechseitige Tafeln des Hämins aus Amylalkohol.
- III. Diäthyläther des Acethämins.
- IV. Monoamyläther des Acethämins.
- V. Hämin aus Aceton.
- VI. Hämin aus einem Tropfen Blut, mit Salzsäure und Aceton erhalten.

Sämmtliche Bilder bei 75maliger Vergrößerung aufgenommen.

II. Zur Kenntniss des Hämatoporphyrins.

Bei der Beschreibung des Darstellungsverfahrens des mittelst Bromwasserstoff in Eisessig erhaltenen Hämatoporphyrins wurde angegeben, dass gegen Ende der Operation, zur völligen Umwandlung des Hämins, die Lösung auf dem Wasserbade erwärmt werden soll.¹⁾ Seither haben wir mitgetheilt,²⁾ dass, um bessere Ausbeute an Hämatoporphyrin zu erzielen, es zweckmässig ist, vor dem Erwärmen das Hämin mit der Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig mindestens 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen zu lassen. Wir haben in der letzten Zeit, und zwar mit Vortheil, das Erwärmen auf dem Wasserbade ganz weggelassen. Unser jetziges Verfahren zur Darstellung des Hämatoporphyrins ist daher folgendes:

Je 5 g Hämin — es ist besser, mit kleinen Portionen zu operiren — werden in 75 ccm. bei 10° C. mit Bromwasserstoff gesättigtem Eisessig (welche Lösung von der Firma Kahlbaum in Berlin bezogen werden kann) in kleinen Portionen und unter häufigem Umrühren eingetragen. Man lässt nun die Flüssigkeit 3—4 Tage bei Zimmertemperatur stehen, schüttelt öfters um, und wenn alles Hämin gelöst ist und die Lösung die schön rothe Farbe des Hämatoporphyrins angenommen hat, wird der Kölbcheninhalt in destillirtes Wasser ge-

¹⁾ Wiener Monatshefte f. Chem., 1888, S. 82.

²⁾ Wiener Monatshefte f. Chem., Bd. X, S. 568.

geringer Bodensatz entsteht, filtrirt. Die weitere Verarbeitung geschieht, wie früher angegeben, d. h. die filtrirte Lösung wird so lange mit Natronlauge versetzt, bis aller Bromwasserstoff neutralisirt ist, wobei der in verdünnter Essigsäure unlösliche Farbstoff fast vollständig ausfällt. Man lässt absetzen und wäscht den Niederschlag durch Decantation so lange aus, bis das Filtrat mit Silbernitrat keinen Niederschlag mehr gibt. Der ausgewaschene Niederschlag wird, nachdem er durch Liegen auf Fliesspapier den grössten Theil des Wassers verloren, noch feucht mit reiner verdünnter Natronlauge auf warmem Wasserbade eine Viertelstunde digerirt, von dem abgeschiedenen Eisenoxydulsalz filtrirt und aus dem alkalischen Filtrat durch Essigsäure der Farbstoff gefällt. Das abgeschiedene Hämatoporphyrin wird jetzt von Neuem gut ausgewaschen, vom Filter abgehoben, mit wenig Wasser in einer Schale zu einem dicken Brei angerührt und unter Umrühren mit kleinen Portionen Salzsäure so lange versetzt, bis der Farbstoff in Lösung gegangen ist. Das salzsaure Hämatoporphyrin ist in Wasser leicht löslich, mit zunehmendem Gehalt an Säure nimmt die Löslichkeit bedeutend ab; es ist deshalb rathsam, nach erfolgter Lösung von dem geringen harzigen Rückstand abzufiltriren und dem Filtrat noch Salzsäure zuzusetzen. Sollte jetzt noch ein harziger Niederschlag entstehen, so filtrirt man von Neuem davon ab und stellt das Filtrat im Vacuum über SO_4H_2 zur Krystallisation auf. Gewöhnlich schon nach einigen Stunden erstarrt die Flüssigkeit in der Schale zu einem Krystallbrei. Man lässt jedoch noch 2—3 Tage im Vacuum stehen, filtrirt hierauf auf einem Saugfilter ab und wäscht die Krystalle mit 10%iger Salzsäure nach.

Durch einmaliges Umkrystallisiren der auf obige Weise zwischen Fliesspapier getrockneten Krystalle wird das salzsaure Hämatoporphyrin chemisch rein erhalten. Den Vortheil dieses verbesserten Verfahrens illustriert folgender Versuch:

Je 10 g der mittels Kochsalz und Eisessig dargestellten Häminkrystalle wurden mit 75 ccm. BrH in Eisessig drei Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde

zweite Portion erst auf dem Wasserbade erwärmt, bis der grösste Theil von BrH entwichen war, und ebenfalls mit 1,5 Liter Wasser vermischt. Die weitere Verarbeitung geschah, wie oben angegeben. Nach Entfernung des Eisenoxyduls wurde das alkalische Filtrat gemessen und aus je 20 ccm. das Hämatoporphyrin mit Essigsäure ausgefällt, gewaschen, im Vacuum getrocknet und gewogen. Andererseits wurde die Hauptmenge des Filtrates auf salzsaures Hämatoporphyrin verarbeitet.

Aus 10 g des nicht erwärmten Hämins erhielten wir 9,1 g Hämatoporphyrin und 9,2 g der im Vacuum getrockneten, nicht umkrystallisirten Krystalle des salzsauren Salzes.

Aus 10 g des erwärmten Hämins erhielten wir 8,8 g Hämatoporphyrin und 4,97 g des salzsauren Salzes.

Im ersteren Falle war die Lösung prächtig roth, während sie im zweiten Falle, also nach dem Erwärmen, einen Stich ins Bräunliche hatte; auch krystallisirte das salzsaure Salz aus der nicht erwärmten Portion viel schöner und reichlicher aus. Dieser Versuch bestätigt die übrigens schon von W. Küster¹⁾ hervorgehobene Thatsache, dass das Häminmolekül aus zwei Hämatoporphyrinmolekülen aufgebaut ist, welche vielleicht durch das Eisen zusammengehalten werden. Alle Aether des Hämins geben dasselbe Hämatoporphyrin. Wir haben ausser dem früher von Nencki und Sieber mittels Amylalkohols dargestellten Hämin auch das Acethämin und das Aethylacethämin in Hämatoporphyrin verwandelt und in den Löslichkeitsverhältnissen und der Krystallform des salzsauren Salzes keinen Unterschied gefunden; auch ergaben die Elementaranalysen des aus den eben genannten Häminen dargestellten Hämatoporphyrins die gleichen, mit der Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ übereinstimmenden Zahlen.²⁾ Nur ist die Ausbeute an Hämatoporphyrin verschieden; das beste Resultat wurde aus Acethämin oder dem Hämin nach Nencki und Sieber

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Jahrgang 1897, S. 105.

2) Vgl. die vorhergehende Mittheilung u. Bialobrzski, Ber. d. chem. Gesellsch., 1896, S. 2850.

Aethyläther. Zur völligen Spaltung resp. Verseifung ist es hier zweckmässig, die bromwasserstoffsäure Lösung nach drei- bis viertägigem Stehen kurze Zeit in einem auf 50—60° temperirten Wasserbade vor dem Eingiessen in das Wasser zu erwärmen. Reines Hämatin mit Bromwasserstoff in Eisessig nach mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur gibt ebenfalls Hämatoporphyrin, jedoch in bedeutend geringerer Menge. Wir haben so aus Hämatin das salzsaure Hämatoporphyrin rein und krystallinisch dargestellt.

Salzsaures Hämatoporphyrin ist in Alkohol, namentlich 60—70%igem, bedeutend leichter löslich als in Wasser, doch eignet sich Alkohol zum Umkrystallisiren dieser Verbindung nicht. Die Lösung muss ziemlich weit im Vacuum concentrirt werden und die abgeschiedenen Krystalle sind sehr klein und nicht schön ausgebildet. In alkoholischem Ammoniak gelöstes Hämatoporphyrin bildet damit beim Stehen im Vacuum ein in rothen Nadeln krystallisirendes Salz, das jedoch sehr unbeständig ist. Um das Ammoniaksalz in grösserer Menge darzustellen, wurde reines, aus dem krystallinischen salzsauren Salze mit Natriumacetat gefälltes Hämatoporphyrin in alkoholischem Ammoniak gelöst und die vom Ungelösten filtrirte Lösung im Vacuum über SO_4H_2 zum Verdunsten hingestellt. Nach zweitägigem Stehen bildete sich am Rande ein braune Krystallkruste, während am Boden der Schale ganz homogene Krystallnadeln sich absetzten. Sie wurden, ohne die Randkruste mitzunehmen, abfiltrirt, mit etwas absolutem Alkohol nachgewaschen, anfangs auf Fliesspapier, sodann, da uns Vorversuche zeigten, dass das Salz leicht Ammoniak verliert, im Exsiccator über Chlorcalcium und Salmiak getrocknet. Trotzdem verlor das Präparat fortwährend an Gewicht und bräunte sich an der Oberfläche stark. Als das Präparat nach mehrwöchentlichem Stehen annähernd constantes Gewicht erlangte, ergab eine Stickstoffbestimmung, dass das Salz sich fast vollständig dissociirt hatte. Gefunden wurden 10,52 % N. Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{NH}_3$ 13,8 % N; für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ 9,79 % N.

Auf ähnliche Weise suchten wir auch das Kaliumsalz

noch aus der wässrigen Lösung krystallinisch erhalten.

Von besonderm Interesse mit Rücksicht auf den molekularen Bau des Hämatoporphyrins war es, den Charakter der drei Sauerstoffatome dieser Substanz zu bestimmen. Weder mit Diamid noch mit alkoholischer Phenylhydrazinlösung und Essigsäure haben wir ein Derivat erhalten, sodass die Gegenwart eines Aldehyd- oder Ketonsauerstoffs in Hämatoporphyrin ausgeschlossen ist. Das Hämatoporphyrin verhält sich wie eine Amidosäure, da es sowohl mit Säuren wie mit Basen Verbindungen eingeht. Fraglich ist es nur, ob der saure Charakter durch Carboxyl oder Hydroxylgruppen bedingt ist. Um der Frage näher zu treten, haben wir den Methyl- und den Aethyläther des Hämatoporphyrins dargestellt und constatirt, dass in dem Hämatoporphyrinmolekül 2 Wasserstoffe durch Alkyl ersetzt werden.

Wird in eine methyl- oder äthylalkoholische Lösung des Hämatoporphyrins trockenes Salzsäuregas eingeleitet, so findet zwar eine Aetherificirung statt, kenntlich daran, dass durch Wasserzusatz ein Theil der Substanz gefällt wird und sich in verdünnter Natronlauge nicht mehr löst; aber selbst bei mehrstündigem Einleiten des Gases und Erwärmen bleibt ein beträchtlicher Theil des Hämatoporphyrins unverändert, während ein anderer Theil in die Anhydridverbindung übergeht und verharzt, sodass wir es zweckmässiger gefunden haben, den Vorschlag von E. Fischer und A. Speier¹⁾ befolgend, das Hämatoporphyrin in alkoholischer Lösung bei geringerem Säuregehalt zu ätherificiren.

2 g chemisch reines Hämatoporphyrin wurden mit einer Mischung von 20 g absolutem Methylalkohol und 2 g conc. SO_4H_2 auf dem Wasserbade am Rückflusskühler 4 Stunden lang erwärmt. Hierauf wurde die schön violettrothe Lösung in 2 Liter Wasser unter Umrühren gegossen und der feinkörnige, amorphe und schlecht filtrirende Niederschlag auf einem Filter aus gehärtetem Papier unter Anwendung der Saugpumpe abfiltrirt und mit Wasser

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesell. 28. 3252.

Das nur an der Luft zwischen Fliesspapier getrocknete und in verdünnter Natronlauge in der Kälte völlig unlösliche Präparat ergab bei der Elementaranalyse folgende Zahlen:

0,2371 g gaben 0,5996 g CO_2 u. 0,1472 g H_2O entsprechend 68,96% C und 6,90% H.

0,1572 „ „ 11,8 ccm. N-Gas bei 14,7% T. u. 757 mm. Bst. = 8,80% N.

Ein anderes Präparat haben wir mittelst 5%igen Chlorwasserstoffs ätherificirt. 4,5 g krystallisirtes salzsaures Hämatoporphyrin wurden an der Luft, später im Vacuum getrocknet, hierauf mit 50 ccm. absoluten Methylalkohols, der 5% HCl enthielt, 12 Stunden lang am Rückflusskühler auf dem Wasserbade zum Kochen erhitzt. Die schön rothe Lösung wurde hierauf in 2 Liter Wasser gegossen, der feine und schlecht filtrirende, amorphe Niederschlag auf ein Saugfilter von gehärtetem Filtrirpapier gebracht und bis zum Verschwinden des Chlors im Filtrate ausgewaschen. Das anfangs zwischen Fliesspapier, sodann über SO_4H_2 getrocknete Präparat ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0,2722 g gaben 0,6907 g CO_2 u. 0,1733 g H_2O = 69,18% C u. 7,07% H.

0,2417 „ „ 17,9 ccm. N-Gas bei 16,4° T. u. 769 mm. Bst. = 8,76% N.

Aus den übereinstimmenden Analysen der beiden Präparate geht hervor, dass in dem Hämatoporphyrinhydrat zwei Hydroxylwasserstoffe durch Methyl ersetzt wurden.

Berechnet für: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}(\text{OCH}_3)_2\text{N}_2\text{O}$.

Gefunden:

C 68,79%

C 68,96 und 69,18%

H 7,00%

H 6,90 „ 7,07%

N 8,91%

N 8,80 „ 8,76%

Diese Formel wird noch durch eine Methoxylbestimmung bestätigt, wobei das mittelst HCl erhaltene Dimethylhämatoporphyrin mit Jodwasserstoff im Zeissl'schen Apparate allmählich auf 145° erhitzt wurde.

0,2301 g gaben 0,3053 g AgJ = 8,47% CH_3 . Ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}(\text{OCH}_3)_2\text{N}_2\text{O}$ 9,5% CH_3 . Es wurde also auch hier, ähnlich wie bei einigen Häminäthern etwa 1% Alkyl zu wenig gefunden. Die procentische Zusammensetzung des Monomethyläthers $\text{C}_{16}\text{H}_{17}(\text{OCH}_3)\text{N}_2\text{O}$ ist: C 68,00%, H 6,66%, N 9,33% und der Gehalt an Methyl = 4,7%.

wir 3,5 g des Aethers.

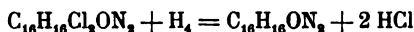
Das Dimethylhämatoporphyrin ist ein amorphes ziegelrothes Pulver, das an der Luft sich bald oberflächlich bräunt und missfarbig wird, wesshalb es für Elementaranalysen möglichst sorgfältig und rasch zwischen gehärtetem Filtrirpapier (um jede Verunreinigung durch Papierfasern zu vermeiden), sodann im Exsiccator getrocknet werden muss. In Wasser und verdünnten Alkalien ist es völlig unlöslich und erst beim Kochen mit den Letzteren geht es allmählich in Lösung über. Leicht löslich ist es in Alkohol, Methylalkohol, Aether, Essigäther, Benzol und wässerigen Mineralsäuren und wird dem Aether, Essigäther oder Benzol durch wässrige Salzsäure entzogen. Es gelang uns aber nicht, weder mit Salzsäure noch mit anderen Säuren, krystallinische Salze des Dimethylhämatoporphyrins darzustellen. Im Capillarröhrchen erhitzt, beginnt das Dimethylhämatoporphyrin schon gegen 60° zu sintern und ist gegen 85° unter Gasentwicklung zu einem klaren Tropfen geschmolzen. Als eine Probe der Substanz gegen 100° erwärmt wurde, schmolz sie zu einer dunkelrothen Flüssigkeit, es entwich Methylalkohol und hinterblieb ein amorpher Rückstand, der in Säuren und Alkalien unlöslich war und dessen Elementaranalysen am nächsten der Formel: $C_{34}H_{36}N_4O_4$, also wahrscheinlich $C_{32}H_{30}(CH_3)_2N_4O_4$ entsprachen. Aber ebensowenig wie aus dem Hämatoporphyrinhydrat das Anhydrid $C_{32}H_{32}N_4O_4$, gelang es uns, aus dem Dimethyläther, selbst beim Erhitzen auf 130° , den Aether des Hämatoporphyrinanhydrids rein zu erhalten.

Auf ähnliche Weise wie den Dimethyläther haben wir auch den Diäthyläther des Hämatoporphyrins dargestellt. Auch dieser Aether schmilzt und spaltet Aethylalkohol schon unter 100° ab. Ein bei 110 — 115° bis zu constantem Gewichte getrocknetes Präparat des Diäthylhämatoporphyrins ergab uns bei der Verbrennung 72,28% C, 6,49% H und 9,24% N, also Zahlen, welche ziemlich nahe der Formel: $C_{32}H_{30}(C_2H_5)_2O_4N_4$ stehen. (Ber. 72,97% C, 6,75% H, 9,46% N.) Dieses Produkt war in verdünnten Mineralsäuren und Alkalien unlöslich, wenig

dieses Hämatoporphyrins ist die durch Einwirkung verschiedener Reduktionsmittel auf Hämin oder Hämatoporphyrin entstehende und von uns als Hexahydrohämatoporphyrin früher beschriebene Verbindung.¹⁾ Die durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Hämatoporphyrin entstehende Verbindung ist das Acetyl-derivat des zweiten Anhydrids des Hämatoporphyrins von der Formel $C_{52}H_{32}N_4O_4$. Wir haben die Untersuchung über das Hämatoporphyrin wieder aufgenommen, indem wir uns als Hauptziel vorgesetzt haben, eine Reaction zu finden, um vom Hämatoporphyrin durch Entziehung von zwei Atomen Sauerstoff, zu dem Phylloporphyrin, dem von Marchlewski und Schunk²⁾ genauer untersuchten Derivate des Chlorophylls zu gelangen. Bei der Eigenschaft des Hämatoporphyrins, unter Wasseraustritt Anhydride zu bilden, deren Spectra noch mehr als wie das des Hydrats vom Spectrum des Phylloporphyrins entfernt sind, konnten wir von vornherein erwarten, dass Erwärmen auf Temperaturen über 100° , oder Anwendung wasserentziehender Agentien uns nicht zum Ziele führen wird. Leider erwies sich das sonst so energisch Sauerstoff entziehende Diamid dem Hämatoporphyrin gegenüber als unwirksam. In wässriger oder alkoholischer Lösung bei Luftausschluss mit Diamid geschüttelt und erwärmt, bleibt das Hämatoporphyrin unverändert. Im Spectrum fallen die Absorptionsbänder des so behandelten Hämatoporphyrins mit denen des Hämatoporphyrinhydrates zusammen. Wir versuchten, dem Beispiele E. Fischer's³⁾ anlässlich seiner Untersuchungen über die Harnsäure folgend, die beiden Hydroxyle des Hämatoporphyrins zunächst mittelst PCl_5 durch Chlor und hierauf die zwei Chloratome durch Wasserstoff nach folgendem Schema:



und



zu ersetzen.

1) Ibid. Bd. 20, S. 331.

2) Ann. d. Chem. Pharm., 278, 96.

3) Ber. d. deutschen chem. Gesell., Jahrg. 1884, S. 329.

gossen, der Flüssigkeit 2 g reines Hämatoporphyrinhydrat zugesetzt und in einem Kölbchen 5 Stunden lang am Rückflusskühler erwärmt. Eine Einwirkung fand statt. Es entwich HCl und der grösste Theil des Hämatoporphyrins ging in Lösung über. Die gelbbraune Flüssigkeit wurde hierauf vom Ungelösten filtrirt, über Nacht über SO_4H_2 und Aetzkalk im Vacuum stehen gelassen, am nächsten Tage mit Aether übergossen und zur Zerstörung des POCl_3 mit Wasser geschüttelt. Die abgehobene ätherische Lösung wurde verdunstet und der braune amorphe Rückstand in Chloroform gelöst. Nach Abdestilliren des Chloroforms hinterblieb ein brauner Farbstoff in amorphen Körnern zurück, unlöslich in Wasser; in Aether und Alkohol mit braungelber Farbe mit einem Stich ins Grün löslich. Die Lösung, passend verdünnt, zeigt im blauen Theil des Spectrums zwischen der Linie F und der Strontiumlinie einen ziemlich scharf begrenzten Absorptionsstreifen der Wellenlänge $\lambda = 479-466$ entsprechend. In verdünnter Natronlauge löst sich der Farbstoff allmählich auf zu einer klaren braunrothen Flüssigkeit, die im Spectrum keinen Absorptionsstreifen mehr zeigt.

Dieser Versuch war also misslungen, da die Reaction zu weit gegangen ist. Wir versuchten sodann ein biologisches Reductionsmittel — nämlich anäerobiotische Bacterien. Es gelang aber auch dadurch nicht, dem Hämatoporphyrin die zwei Sauerstoffatome zu entziehen.

Es wurden zwei Kolben mit einer Nährlösung von 2,5 g Wittepepton, 0,5 g Traubenzucker und 0,5 g Hämatoporphyrinkalium in 500 ccm. Wasser sterilisirt; der eine mit Sporen von Tetanus, der andere mit den Bacillen des malignen Oedems geimpft und nach 2stündiger Durchleitung von Wasserstoff unter Luftabschluss bei Bruttemperatur stehen gelassen. Schon am nächsten Tage trat in beiden Kolben Gährung ein unter Entwicklung stinkender Gase. Am 4. Tage war das Hämatoporphyrin als rother Bodensatz abgeschieden und die Lösungen begannen sich zu klären. Am 8. Gährungstage wurde der Kolben mit Tetanus und am 12. der mit malignem Oedem geöffnet. In beiden Kolben war der Inhalt stark

abscheidend, die Reaction schwach sauer, und wie die Sedimentationen zeigten, waren die Culturen durch andere Mikroben nicht verunreinigt. Das abfiltrirte und ausgewaschene Hämatoporphyrin erwies sich bei der spectrokopischen vergleichenden Prüfung mit reinem Hämatoporphyrin, sowie durch die Darstellung des krystallinischen salzsauren Salzes als unverändert.

Da in diesen beiden Versuchen durch Zusatz von Traubenzucker die Nährlösung sauer und dadurch das Hämatoporphyrin gleich bei Eintritt der Gährung gefällt wurde, so wiederholten wir den Versuch und impften eine Nährlösung, die in 400 ccm. nicht sterilisirten Leitungswassers 4 g Wittepepton und 0,2 g Hämatoporphyrinkalium enthielt, mit Cholerabacillen. Der atmosphärische Sauerstoff wurde auch hier durch Wasserstoff vertrieben und der Kolben unter Luftausschluss in Thermostaten gestellt. Am folgenden Tage starke Gährung und Entwicklung stinkender Gase. Hämatoporphyrin noch gelöst. Nach 3tägiger heftiger Gährung liess die Gasentwicklung nach und ein geringer Theil des Hämatoporphyrins ist in dem schleimigen Bodensatze abgesetzt. Am 8. Tage ist die Flüssigkeit geklärt, keine Gasentwicklung, der grösste Theil des Hämatoporphyrins im Bodensatze. Der Kolben wird jetzt geöffnet und sein Inhalt entwickelt einen pestilenzialischen Geruch. Mikroskopisch sind nur spärlich Cholerabacillen vorhanden, daneben in grosser Menge lange, bewegliche Bacillen, Kurzstäbchen und Coccen. Die Reaction der Flüssigkeit alkalisch. Sowohl die filtrirte Lösung wie der ausgewaschene Bodensatz zeigen spectrokopisch und chemisch alle Eigenschaften des unveränderten Hämatoporphyrins. Phylloporphyrin konnten wir keins darin finden.

Durch die schönen Untersuchungen von W. Küster¹⁾ und seiner Mitarbeiter wissen wir, dass das Hämatoporphyrin, mit einer Ausbeute von gegen 50%, zu einer Säure von der Formel: $C_8H_9NO_4$ oxydirt werden kann, welche durch Kochen mit Alkalien unter Aufnahme von H_2O und Abspaltung von NH_3 in die Säure: $C_8H_9O_3$ übergeht. Durch Reduction mit

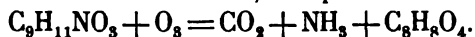
1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 35.

gestellte dreibasische Hämotricarbonsäure $= \text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_6$ über, welche einer vergleichenden Zusammenstellung dieses Autors zufolge in allen Stücken der von Auwers, Köbner und Meyenburg ²⁾ synthetisch dargestellten Aethyltricarbaldehyd-säure gleicht.

Wenn auch die als erstes Oxydationsprodukt auftretende Säure von der Formel $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_4$, sowie die Säure $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ als cyclische Verbindungen aufgefasst werden können, so ist jedenfalls in der Hämotricarbonsäure der Ring gesprengt. Ob das Hämatoporphyrin aus 2 Atomgruppen mit 8 Kohlenstoffen aufgebaut ist oder ob die noch fehlenden 50% an Spaltungsprodukten andere Atomgruppierung haben, bleibt noch zu untersuchen, und es wäre verfrüht, schon jetzt Vermuthungen über die Constitution des Hämatoporphyrinmoleküls zu äussern. Wir wollen aber nicht unterlassen, auf eine Beobachtung hinzuweisen, welche vielleicht zu den von Küster entdeckten Oxydationsprodukten des Hämatoporphyrins in Beziehung steht.

Schon im Jahre 1868 entdeckten O. Schultzen und L. Riess ³⁾ im Harn von Patienten, die an acuter Leberatrophie gestorben sind, eine Säure von der Zusammensetzung $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$. Sie schmilzt bei 162° und gibt, im Glasrohr mit Kalkhydrat erhitzt, braune, ölige Tropfen, welche deutlich nach Phenol riechen und in wässriger Lösung mit Eisenchlorid eine dunkelviolette Färbung geben (l. c. S. 73).

Auf Grund ihrer Analysen und dieser Reaction betrachten sie diese Säure als Oxymandelsäure und bei dem gleichzeitigen Auftreten von Tyrosin im Harn sind sie der Ansicht, dass sie aus dem letzteren abstamme, entsprechend der Gleichung:



Ob die vermuthliche Oxymandelsäure optisch activ war, haben Schultzen und Riess nicht geprüft.

1) Dessen Inauguraldissertation, Tübingen, 1898.

2) Ber. d. d. chem. Gesellsch., 24^a, 310, 24^b 2897.

3) Ueber acute Phosphorvergiftung und acute Leberatrophie. Annal. d. Charité-Krankenhauses zu Berlin, Bd. 15, Jahrg. 1869.

Schultzen und Riess von der Küster'schen stickstofffreien Säure $C_8H_8O_3$ nur durch ein Minus von 1 Atom Sauerstoff. Wünschenswerth wäre es, zu wissen, ob die Küster'schen Säuren nicht optisch activ resp. racemisch sind; denn es ist auffallend, dass nicht einmal bei der Phosphorvergiftung, sondern nur bei der acuten Leberatrophie, wo mit dem raschen Schwund des Leberparenchyms zahlreiche Blutextravasate auftreten, also jedenfalls Zerstörung des Blutfarbstoffs stattfindet, die Säure $C_8H_8O_4$ im Harn gefunden wurde. Andererseits zeigen die erst kürzlich aus unserem Institute publicirten Untersuchungen, wie in Folge der Leberentfernung der Organismus mit sauren Stoffwechselprodukten überschwemmt wird.

Die chemische Zusammensetzung menschlichen Chylusfettes.

Von

Demonstrator **Franz Erben.**

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 11. Juli 1900.)

Die seltene Gelegenheit, einen Fall von Chylurie durch längere Zeit beobachten zu können, bot mir die Möglichkeit, eine grössere Menge menschlichen Chylusfettes für eine chemische Analyse desselben sammeln zu können. Die Resultate der klinischen Beobachtung, die zu der Annahme drängte, dass der vorliegende Fall europäischer, nichtparasitärer Chylurie gleich der tropischen parasitären der Beimischung von Chylus zum Harn seine Entstehung verdankt, werden Dr. v. Stejskal und Dr. Franz in einer grösseren klinischen Arbeit niederlegen. Die vorliegenden Zeilen, die mit der klinischen Behandlung des Falles in keiner nähern Beziehung stehen, sind der chemischen Untersuchung des Harnfettes gewidmet.

Es sei mir aber gestattet, an erster Stelle unter Beziehung der klinischen Beobachtungen die Berechtigung, das Harnfett als Chylusfett anzusprechen, zu beweisen, wobei ich aber der Vollständigkeit der Beweisführung halber die zu derselben nothwendigen Daten der chemischen Analyse des Harnfettes antecipiren muss. Die Ergebnisse der klinischen Versuche sind folgende:

1. Der Harn wurde nach zwölfstündigem Hungern bis auf minimale Spuren fettfrei. Zwei bis drei Stunden nach der ersten Nahrungsaufnahme konnte Fett wieder deutlich nachgewiesen werden.

eine fast vollkommen fettfreie Nahrung, die aber für die Ernährung genügende Mengen Eiweiss und Kohlehydrate dem Organismus zuführte, erhielt. Inanition war also bei diesem Versuch vollständig ausgeschlossen.

3. Mit Sudan III. gefärbtes Fett, per os eingeführt, erschien nach kürzester Zeit im Harn wieder. Im intensiv roth gefärbten Aetherextract dieses Harnes war Sudan nachweisbar.

4. Der Fettgehalt des Blutes beträgt 0,378%, ist also sicher nicht vermehrt. Der Fettgehalt des Harnes hingegen schwankt zwischen weiten Grenzen, z. B. fand ich in der Eiweissperiode 0,564% bis 2,158%.

Nun können zur Erklärung des Uebertrittes von Fett in den Harn nur folgende Möglichkeiten herangezogen werden:

a) Hochgradige fettige Degeneration der Epithelien des uropoetischen Systems mit Uebergang des Degenerationsfettes in den Harn (eventuell auch fettige Degeneration von Eiter),

b) Secretion des Fettes durch die Nierenepithelien, eventuell auch durch heterologe Elemente,

c) direkter Durchtritt von Fett aus dem Blute in den Harn,

d) direkter Durchtritt fetthaltiger Lymphe (Chylus) in den Harn.

Fettige Degeneration, von vornherein schon unwahrscheinlich, ist auszuschliessen auf Grund der Versuche 2 und 3. Dieser letztere Versuch (Sudanfett) spricht gegen fettige Degeneration auf Grund einer, wie es scheint, von mehreren Seiten gemachten Beobachtung, von deren Richtigkeit ich mich selbst überzeugte, und die dahin geht, dass das im Fettgewebe abgelagerte Fett von Thieren, die mit Sudanfett längere Zeit gefüttert worden waren, sich roth färbte, während pathologisch durch fettige Degeneration (z. B. bei Phosphorvergiftung) auftretendes Fett ungefärbt bleibt. Fettige Degeneration ist aber auch ausgeschlossen wegen der grossen Menge des täglich ausgeschiedenen Fettes (5—30 g) bei der langen Dauer des Zustandes, ferner wegen des Umstandes,

aber flüssig war, und endlich aus den Ergebnissen der chemischen Untersuchung des Harnfettes. Denn nach den Beobachtungen von Lindemann¹⁾ hat Degenerationsfett eine hohe Säurezahl (18,35 d. h. ist reich an freien Fettsäuren), während die Säurezahl unseres Fettes sehr klein ist (3,5).

Gegen die Annahme einer Secretion des Fettes spricht erstens das prompte Ausbleiben beim Hungern, aber auch dann, wenn nur fettfreie Nahrung gereicht wurde (Versuche 1 und 2), zweitens aber auch die Thatsache, dass bei Einfuhr von Lipanin das bei gewöhnlicher Spitalskost feste Fett sofort einem flüssigen Platz machte (siehe weiter unten). Es liegt in dieser prompten Aenderung der Beschaffenheit des Harnfettes durch die des Nahrungsfettes zweifellos ein Moment gegen die Annahme einer Secretion. Es widerspräche allen physiologischen Erfahrungen über die Secretion, wenn in kürzester Zeit nach Aufhören bloss der Fettzufuhr die Secretion vollständig versiegen, resp. bei qualitativer Aenderung des Nahrungsfettes das secernirte Fett plötzlich seine physikalischen Eigenschaften ändern sollte. Mit der Annahme einer Secretion wäre eben nur ein allmähliches, langsames, erst nach dem Verbrauche allen im Körper aufgespeicherten Reservematerials vollständiges Verschwinden, resp. im zweiten Falle, wenn überhaupt, so ein allmählicher Uebergang vereinbar. Es ist daher die Annahme einer Secretion des Fettes vollständig von der Hand zu weisen.

Ob die Annahme Eggels,²⁾ dass das Harnfett aus dem Blute stamme, aus dem es durch Poren, die neben Blutserum wohl feinsten Fetttröpfchen, aber nicht rothen Blutkörperchen die Passage gestatten, in die harnleitenden Wege einfach durchfiltrire, richtig sei, muss eine Bestimmung des Fettgehaltes des Blutes lehren. Das Blut des Eggel'schen Falles wurde von Hoppe-Seyler³⁾ analysirt. Der Aetherextract (Fett und Lecithin) beträgt 0,676 ‰, der Lecithingehalt 0,348 ‰.

1) Ueber das Fett des normalen und fettig entarteten Herzmuskels
Zeitschrift f. Biol. Bd. 38.

2) Archiv für Klinische Medicin, Bd. 4.

3) Medicinisch chemische Untersuchungen, Heft 4, 1869.

ist also erheblich niedriger als der Harnfettgehalt (0,687). Das Gleiche gilt für unsern Fall; der Fettgehalt des Blutes beträgt 0,378‰, der des Harnes z. B. in der Eiweissperiode im Mittel 1,032‰. Aus dem Vergleiche dieser Zahlen ergibt sich, dass ein einfacher Durchtritt fetthaltigen Serums in diesen Fällen unmöglich angenommen werden kann, denn dann müsste der Fettgehalt des Harnes gleich oder höchstens unwesentlich höher (wegen der Resorption von Harnwasser in der Blase) sein als der des Blutes. Die obigen Zahlen könnten nur durch eine Secretion d. h. selective Ausscheidung von Fett aus dem Blute erklärt werden, was wir oben mit zwingenden Gründen ausgeschlossen haben.

Es bleibt also nur die letzte Möglichkeit, die Herkunft des Fettes aus der Lymphe. Dass das Fett aber aus der gewöhnlichen Körperlymphe mit 0,2—0,4‰ Fett nicht stammen kann, erhellt aus denselben Gründen, die wir gegen die Annahme c (aus dem Blute) angeführt haben und die schon Brieger gewürdigt hat. Es kann nur Beimischung von fetthaltiger Lymphe, also der des Darmes (Chylus), angenommen werden, wobei allerdings aus anatomischen Gründen, Rückstauung des Chylus gegen die Nieren mit offener Communication der Chylus- mit den Harnwegen, vorauszusetzen ist. Für diese Annahme sprechen aber direkt die obenangeführten Versuche und die chemische Untersuchung des Harnes.

Nachdem so die Berechtigung, das Harnfett als Chylusfett anzusehen, bewiesen ist, wollen wir nun über die Resultate der chemischen Analyse desselben berichten. Menschliches Chylusfett ist bisher noch nicht genauer untersucht worden.

Spärliche Angaben finden sich bei Hensen,¹⁾ der die chylöse Flüssigkeit, die aus einer Lymphfistel am Präputium eines zehnjährigen Knaben sich entleerte, untersuchte. Dieselbe enthielt bis 2,25‰ Fett. Bei fettarmer Diät sank der Fettgehalt auf 0,62‰. Das Fett enthielt 0,018—0,102‰

1) Pflüger's Archiv für Physiologie, Bd. 10, 1875.

wie er vermuthet, Natronsalze der Oelsäure, Stearin- und Palmitinsäure.

Munk und Rosenstein¹⁾ untersuchten den Chylus aus einer Fistel am Oberschenkel. Das Fett, das sie bei Lipaninfütterung erhielten, war gelb, flüssig, mit einem Erstarrungspunkt unter 4°C., es enthielt 2,4% freie Fettsäure (als Oelsäure gerechnet), $\frac{1}{14}$ — $\frac{1}{16}$ Cholesterin, $\frac{1}{14}$ Lecithin. Die Menge der Seifen machte 4,1—5% der Fettmenge aus. Nach Hammeltalgfütterung war das Fett fest, gelb, der Schmelzpunkt desselben niedriger als der des Hammeltalg. Die Menge der Seifen betrug $\frac{1}{20}$ der des Fettes. Das Fett nach Einnahme von Erucasäure war fest, der Schmelzpunkt 25°, der Erstarrungspunkt 21°; es enthielt 2,5% freie Fettsäuren. 0,078% Fettsäuren wurden aus den Seifen der chylösen Flüssigkeit gewonnen. Ueber das Fett, das bei gewöhnlicher Nahrung erhalten wurde, sind keine Angaben gemacht.

Die folgenden Autoren bearbeiteten Fälle von Chylurie:

Eggel²⁾ stellte aus dem Aeterextract eines chylurischen Harnes Fettsäuren, resp. neutrale Fette, Cholestearin und Lecithin dar.

Brieger³⁾ konnte bei einem Fall von Chylurie, der vollständig dem unserigen analog ist, aus $5\frac{1}{2}$ l Harn 8,93 g Fett extrahiren, das 0,189 g Cholesterin (ca. 2%), Lecithin und 6,73 g Fettsäuren vom Schmelzpunkt 31° enthielt.

Grimm⁴⁾ beschrieb einen Fall von Filaria-Chylurie, bei dem eine Chylusblasenfistel constatirt wurde. Das Fett vom Schmelzpunkte 25° bestand aus 55—67% Palmitin und 33—45% Olein, bei Rapsölfütterung aus 17—22% Glyceriden gesättigter und 83—78% Glyceriden ungesättigter Fettsäuren (Erucasäure).

Das Fett unseres Falles, das mir von dem Vorstande der

1) Virchow's Archiv, Bd. 123, 1890.

2) Archiv für Klinische Medicin, Bd. 4.

3) Diese Zeitschrift, Bd. IV, 1880.

4) Archiv für klinische Chirurgie, 32, 1886 und Virchow's Archiv, Bd. 111, 1888.

Wien, Herrn Regimentsarzt Dr. Franz, gütigst zur Analyse überlassen wurde, wurde aus mehreren getrennten Perioden in der Weise gewonnen, dass der möglichst frische Harn mit einer reichlichen Menge Aether ausgeschüttelt wurde. Die ätherische Lösung wurde durch Destillation vom Aether befreit. Nachdem so alles Fett einer Periode gesammelt war, wurde es im Wasserbade geschmolzen, bis es klar war, und dann durch ein trockenes Filter im Wärmekasten filtrirt.

Es blieb auf dem Filter ein auf demselben festhaftender, in der Wärme zäher, brauner Rückstand, der beim Erkalten fest und am Bruche undeutlich körnig wurde. Diese Substanz war in Aether löslich, wenn auch schwerer als das geschmolzene Fett. Zu einer vorläufigen Prüfung wurde sie mit wenig Aether von der grössten Menge anhaftenden Fettes befreit. Sie löste sich dann in Lauge zu einer opalisirenden Flüssigkeit vom Aussehen einer Seifenlösung vollständig auf. Mit Aether geschüttelt, gingen aus der Lösung die anhaftenden Fettsuren über, erst nach dem Ansäuern die fragliche Substanz. Durch dieses Verhalten war sie als Säure charakterisirt. Sie wurde daher in der Weise gereinigt, dass sie in verdünnter Sodalösung in der Wärme gelöst und, nachdem die Lösung durch mehrmaliges Ausschütteln mit Aether vollständig von Fett befreit war, aus derselben nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure durch Ausschütteln mit Aether wieder gewonnen wurde.

So in reinem Zustande dargestellt, repräsentirte sie sich als eine lichtbraun gefärbte, ziemlich harte, undeutlich krystallinische, einem Fettsäurekuchen ähnliche Masse mit einem Schmelzpunkte von ca. 50°. Aus 100 g Fett wurden etwas über 1 1/2 g in diesem reinen Zustande gewonnen. Zur chemischen Charakterisirung dieses Säuregemenges wurde eine Elementaranalyse und eine Molekulargewichtsbestimmung¹⁾ ausgeführt.

1) I. 0,0972 g Substanz gab 0,2582 g CO₂ und 0,1022 g H₂O,

II. 0,1060 „ „ „ 0,2817 „ CO₂ „ 0,1128 „ H₂O.

Die Substanz ist N-, P-, S-, und aschefrei.

III. 0,0982 g Substanz verbrauchte 3,0 ccm. KHO-Lösung (1 ccm. = 0,005808 g KHO). Die Verseifungszahl beträgt also 177,4.

Fett verwendet wurde, noch täglich eine Flasche (250 g) Lipanin erhielt. Ich habe schon oben angedeutet, dass der Vergleich der Eigenschaften des Fettes in den vorigen Perioden mit dem dieser Periode mit Entschiedenheit gegen die Annahme einer Secretion des Fettes spricht.

Das Fett der IV. Periode von demselben Aussehen wie das der I. und II. stammt aus einer kurzen Versuchsperiode, in der der Patient $\frac{1}{2}$ kg Walrat erhielt. In dieser Fettportion (ca. 80 g) wurde der Nachweis des Cetylalkohols in folgender Weise versucht.

Nach dem Verseifen mit alkoholischer Kalilauge wurde die Seife in viel warmem Wasser gelöst und die Lösung mit Aether einige Male ausgeschüttelt. Der Aetherrückstand wurde in warmem Alkohol gelöst und durch Auskrystallisirenlassen nach wiederholtem Einengen von Cholesterin befreit. Es blieb so ein geringer Rückstand, der, nochmals verseift, aus alkalischer Lösung an Aether so gut wie nichts mehr abgab. Es war also Cetylalkohol trotz reichlicher Zufuhr von Walrat nicht nachzuweisen, ein Verhalten, das einerseits die Angaben von Munk und Rosenstein¹⁾ bestätigt, andererseits in Bezug auf unsern Patienten den Schluss gestattet, dass die die Fettassimilation betreffenden Qualitäten der Darmschleimhaut intact sein müssen.

Zu den im Folgenden beschriebenen qualitativen Bestimmungen wurde, wenn nicht anders bemerkt, das Fett der Periode I verwendet.

I. Quantitative Bestimmungen.

Zu diesen wurde das Fett im Wasserstoffstrom 3 Stunden bei 110—120° getrocknet.

Die Elementaranalyse ergab:2)

C 76,59%

H 11,88%

O 11,55%.

1) l. c.

2) 0,2878 g Fett gab 0,8157 g CO₂ und 0,3078 g H₂O,

C 76,52%
H 12,11%
O 11,37%

Von den Constanten des Fettes wurden bestimmt²⁾:

Specif. Gewicht bei 15° C.:	0,920, 0,905 ³⁾
Schmelzpunkt	44°
Erstarrungspunkt.	26°
Säurezahl	3,508
Verseifungszahl	199,579
Aetherzahl.	196,071
Reichert-Meissl-Zahl . . .	2,254
Hehnerzahl	94,92
Jodzahl	54,42
Schmelzpunkt der unlöslichen Fettsäuren	44°
Erstarrungspunkt	> > 39,50
Verseifungszahl	> > 201,785

1) 0,1492 g Fett gab 0,4193 g CO₂ und 0,1622 g H₂O.

2) Diese Bestimmungen wurden nach dem ausgezeichneten Werke von Benedikt-Ulzer, Analyse der Fette und Wachsarten, Berlin 1897, vorgenommen.

Bestimmung der Säurezahl: 6,1025 g Fett verbrauchen 3,75 ccm. Lauge (1 ccm. = 0,005714 g KHO).

Bestimmung der Verseifungszahl: 5,0859 g Fett werden mit 75 ccm. Lauge (1 ccm. = 0,025909 g KHO) verseift; zur Retitrirung werden 27,7 ccm. Salzsäure (1 ccm. entspricht 1,299 ccm. der Lauge) gebraucht.

Bestimmung der Reichert-Meissl-Zahl (nach Bondzynski und Rufi) und der Hehnerzahl: 5,0859 g Fett geben 4,8278 g unlösliche Fettsäuren, die zur Sättigung 37,6 ccm. Lauge (1 ccm. = 0,025909 g KHO) brauchen; die löslichen Fettsäuren brauchen 2,25 ccm. Lauge (1 ccm. = 1,019 ccm. $\frac{n}{10}$ KHO = 0,005714 g KHO).

Bestimmung der Jodzahlen nach Hübl: Zu 1,1893 g Fett werden 40 ccm. Hübl'sche Jodlösung (1 ccm. = 0,02351 g Jod) zugefügt und zur Retitrirung 23,4 ccm. Hyposulfitlösung (1 ccm. = 0,533 ccm. Jodlösung) verbraucht. 1,3184 g unlösliche Fettsäuren, 40 ccm. Jodlösung, zur Retitrirung 19,7 ccm. Hyposulfitlösung.

Bestimmung des Cholesterins: 6,7044 g Fett geben 0,1150 g Cholesterin.

Bestimmung des Lecithins: 20,0 g Fett geben nach dem Verpuffen mit Soda und Salpeter 0,0154 g Mg₃P₂O₇, was einer Menge von 0,111958 g Lecithin entspricht.

3) Diese Zahl bezieht sich auf das flüssige Fett der Periode III.

Acetylzahl	,	12,164 ¹⁾
Acetylverseifungszahl	,	213,738 ¹⁾
Jodzahl	,	52,605

Aus diesen Bestimmungen berechnen sich folgende Werthe:

Gehalt des Fettes an freien Fettsäuren:	1,680% ²⁾
> Neutralfett	95,987%
> Lecithin	0,560%
> Cholesterin. . . .	1,715%
> Glycerin	10,717%
> Gesamtfettsäuren.	95,573%
> löslichen Fettsäuren	0,65 %
> unlösl. Fettsäuren .	94,92% ³⁾

Das mittlere Molekulargewicht der Gesamtfettsäuren beträgt	268,64 %
der unlösl. Fettsäuren .	278,01 %
> löslichen Fettsäuren	133,8 %

Die unlöslichen Fettsäuren bestehen aus

58,4% Oelsäure
31,3% Stearinsäure
10,3% Palmitinsäure

oder unter Berücksichtigung der Oxyfettsäuren und der Myristinsäure näherungsweise:

58,4% Oelsäure
6,6% Oxystearinsäure ³⁾
25% Stearinsäure
9% Palmitinsäure
1% Myristinsäure. ⁴⁾

1) Bestimmung der Acetylsäure- und Acetylzahl der unlöslichen Fettsäuren (in dem Fett der Periode II bestimmt): 3,4001 g acetylierte Fettsäuren verbrauchen zur Neutralisation 23,2 ccm. Kalilauge (1 ccm. = 0,029542 g KHO). Zur Verseifung werden 50 ccm. derselben Kalilauge zugefügt. Retitrierung werden 43 ccm. Salzsäure (1 ccm. = 1,13 ccm. Kalilauge) gebraucht.

2) Aus der Säure- und Verseifungszahl des Fettes berechnet; aus der Säurezahl allein unter der Annahme, das die freien Fettsäuren dasselbe mittlere Molekulargewicht haben wie die an Glycerin gebundenen, ergibt sich 1,738%.

3) Aus Acetylzahl der Fettsäuren (Fett der Periode II) berechnet.

4) Schätzungsweise.

Zu derselben wurden 200 g Fett mit alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbade verseift. Zweistündiges Kochen genügte zur vollständigen Verseifung. Der Seifenleim wurde mit viel Wasser verdünnt und zur Vermeidung der Bildung von Emulsionen die noch ca. 40° warme Lösung einige Male mit Aether ausgeschüttelt. Diese Aetherauszüge hinterliessen nach dem Abdestilliren des Aethers einen tiefgelben, krystallinischen Rückstand unverseifbarer Substanz. Die wässerige Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt. Der nach dem Verdunsten des Aethers bleibende Rückstand wurde 6 Stunden lang im Dampfstrom destillirt und so in flüchtige und nicht flüchtige Fettsäuren getrennt.

Die saure, wässerige Flüssigkeit wurde mit Baryumcarbonat neutralisirt und eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mit Alkohol extrahirt, die alkoholische Lösung eingedampft, der Rückstand durch mehrmaliges Aufnehmen mit Alkohol, Filtriren und Eindampfen gereinigt und zuletzt im Vacuum destillirt.

Das Destillat ist eine schwach gelbgefärbte, dickliche, süssschmeckende Flüssigkeit. Sie löst Kupferoxydhydrat und Eisenhydroxyd, gibt mit saurem schwefelsauren Kalium, wie mit Phosphorsäureandrydrid erwärmt Acroleindämpfe, macht aus Borax Borsäure frei, reducirt nach längerem Kochen ammoniakalische Silberlösung und gibt die Reichl'sche Reaction (mit Pyrogallol und Schwefelsäure). Dadurch ist die Flüssigkeit als Glycerin identificirt.

Die unverseifbare Substanz, aus Alkohol mehrmals umkrystallisirt, lieferte blättchenförmige, durchsichtige Krystalle, die die Reactionen mit Salpetersäure, mit Chloroform und Schwefelsäure und die Liebermann'sche Cholestolreaction geben. Die aus Aether umkrystallisirte Substanz hat den Schmelzpunkt 147°. Die Elementaranalyse¹⁾ ergab :

1) 0,2116 g Substanz gab 0,6505 g CO₂ und 0,2451 g H₂O.

C	85,82%	85,87%
H	11,90%	11,86%
O	4,26%	4,27%

Die vorliegende Substanz ist also Cholesterin.

Nach dem vollständigen Ausrystallisiren des Cholesterins blieb beim Verdampfen der Mutterlauge ein geringer unkrystallisirter Rückstand, der nochmals verseift wurde. Aus alkalischer Lösung liess sich dann mit Aether fast nichts mehr extrahiren. Cetylalkohol oder andere unverseifbare Substanzen ausser Cholesterin sind also nicht vorhanden.

Die flüchtigen Fettsäuren wurden nach dem Eindampfen mit BaH_2O_3 und Aufnehmen mit H_2SO_4 -haltigem Wasser nochmals destillirt. Das Destillat zeigte einen deutlichen Schweissgeruch (Capron- oder Caprylsäure), mit Eisenchlorid eine kaum wahrnehmbare Rothfärbung (Essigsäure) und reducirte Silberlösung (Ameisensäure). Wie oben angeführt, ist das Molekulargewicht der löslichen Fettsäuren 133,8. Das Molekulargewicht der Caprylsäure beträgt 144, das der Capronsäure 116, das der Ameisensäure 46. Nach diesen Zahlen wäre die Gegenwart der Caprylsäure wahrscheinlicher. Es war jedoch wegen der geringen Menge dieser Fettsäuren nicht möglich, sie genauer zu untersuchen, resp. durch die Barytgehalte ihrer Baryumsalze zu identificiren. Aus diesem Grunde kann auch über die Gegenwart von Buttersäure, die man erwarten sollte, nichts ausgesagt werden.

Die nicht flüchtigen Fettsäuren wurden in warmem Alkohol gelöst und die nach dem Erkalten ausfallenden Antheile abfiltrirt und mit Alkohol gewaschen. Die Lösung wurde mit Bleizucker versetzt und, wie unten näher angeführt ist, weiterbehandelt. Der Rückstand aber wurde auf dem Filter mit warmem Alkohol gelöst und der beim Erkalten wieder ausfallende geringe Niederschlag auf Arachinsäure geprüft, während die Lösung als ölsäurefrei sofort mit Magnesiumacetat fractionirt wurde. Um einer Esterification der eventuell vorhandenen Arachinsäure vorzubeugen, war nicht mit kochendem, sondern nur mit warmem Alkohol operirt worden. Der

auch die erste Fraction desselben mit essigsaurer Magnesia gab denselben Schmelzpunkt, sodass Arachinsäure in nachweisbarer Menge nicht vorhanden war.

Die ersterhaltene alkoholische Lösung, die alle Oelsäure enthalten musste, wurde zur Trennung derselben von den gesättigten Fettsäuren mit einer Lösung von essigsauerm Blei versetzt, mit viel Wasser verdünnt, der Niederschlag von fettsauerm Blei durch Erwärmen geballt, abfiltrirt, zwischen Filtrirpapier abgepresst und einige Tage im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Dann wurde durch Behandeln mit kaltem Aether das ölsäure Blei von den Bleisalzen der gesättigten Fettsäuren getrennt.

Das ölsäure Blei wurde mit warmer HCl zerlegt, die Oelsäure öfter mit warmem Wasser gewaschen und in NH_3 gelöst. Durch Ausfällen dieser ammoniakalischen Lösung mit Barythydrat wurde das Baryumsalz der Oelsäure dargestellt, das nach langem Auswaschen mit Wasser und Umkrystallisiren aus heissem Alkohol einen Baryumgehalt von 19,96%¹⁾ aufwies, der mit dem für Oelsäure berechneten von 19,62% stimmt.

Die festen Fettsäuren wurden in alkoholischer Lösung mit essigsaurer Magnesia, und, wenn diese keine Fällung mehr gab, mit essigsauerm Blei fractionirt gefällt, die einzelnen Fractionen in der gleichen Weise weiter fractionirt, bis der Schmelzpunkt einer Fraction constant blieb. Auf diese Weise wurden folgende Fettsäuren isolirt : *

1. Stearinsäure, Schmelzpunkt 69—69,2°, 0,2105 Substanz gab 0,5891 g CO_2 und 0,2407 g H_2O .

Gefunden :

C 75,94%

H 12,71%

O 11,35%

Berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$:

76,06%

12,68%

11,26%

0,2056 g des Silbersalzes gaben 0,0570 g Ag.

Gefunden 27,72% Ag.

Berechnet 27,62% *

1) 0,3857 g ölsaurer Baryt gaben 0,1310 g BaSO_4 . Der Erstarrungspunkt der erhaltenen Oelsäure war 6°, der Schmelzpunkt 16°.

0,1000 g CO_2 und 0,2010 g H_2O .
Berechnet für: $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_2$.

Gefunden: C 75,14% 75,00%

H 12,67% 12,50%

O 12,19% 12,50%

0,4156 g des Silbersalzes gaben 0,1226 g Ag.

Gefunden 29,50% Ag.

Berechnet 29,69% »

3. Myristinsäure, Schmelzpunkt 54° , 0,1376 g Substanz gab 0,3730 g CO_2 und 0,1540 g H_2O .

Gefunden:

Berechnet für: $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$.

C 73,87% 73,68%

H 12,46% 12,30%

O 13,67% 14,02%

0,1407 g Silbersalz gaben 0,0450 Ag.

Gefunden: 32,0 % Ag.

Berechnet: 32,14% »

Stearinsäure wurde in bedeutend grösserer Menge als Palmitinsäure erhalten. Die Menge der Myristinsäure schätze ich auf etwa 1%.

III. Qualitative Reactionen.

Diese wurden nach dem Verfahren von Crace-Calvert vorgenommen, wobei die unten beschriebenen Farbenveränderungen beobachtet wurden. Zu diesen Reactionen wurde das flüssige Fett der Periode III verwendet.

1. Natronlauge (spec. Gew. 1,340): dunkelgelb, fest.
2. Schwefelsäure (» » 1,475): schwachgelb.
3. Schwefelsäure (» » 1,530): röthlich.
4. Schwefelsäure (» » 1,635): dunkelrothbraun.
5. Salpetersäure (» » 1,180): schwachgelb.
6. Salpetersäure (» » 1,220): schwachgelb-röthlich.
7. Salpetersäure (» » 1,330): röthlich.
8. Die nach 7 erhaltene Masse mit Natronlauge erwärmt: schmierige, hellbraune Masse.
9. Syrupöse Phosphorsäure: rothgelb.
10. Salpetersäure (1,330) und Schwefelsäure (1,345) aa part. aeq.: gelb.
11. Königswasser: gelb.

schmierige hellbraune Masse.

Reactionen nach Gläser:

Rothe, rauchende Salpetersäure: eine rothe Zone, nach 1 Stunde unten ein grüner, darüber ein rosenrother Farbenring.

Concentrirte Schwefelsäure: an der Berührungsstelle braunroth.

Diese Reactionen nach Crace-Calvert nähern sich denjenigen, die die Thranen (rothe und braune Färbungen) geben, während nicht die leiseste Andeutung einer grünen Färbung, die den Pflanzenölen (auch dem zur Gewinnung dieser Fettportion in grösserer Menge eingeführten Olivenöl) zukommt, beobachtet wurde, ein Beweis, dass jene die Farbenreactionen bedingenden, charakteristischen Verunreinigungen (Lipochrome etc.) des Nahrungsfettes die Darmwand nicht passieren, dass hingegen schon in der Darmwand die dem thierischen Fette eigenthümlichen Lipochrome etc. gebildet werden oder dem resorbirten Fett sich beimengen.

Anhangsweise will ich noch die auf die Seifen des Harnes, resp. Chylus sich beziehenden Zahlen hier anführen. Die aus einer Tagesmenge Harns gewonnenen Fettsäuren von 0,1403 g Gewicht verbrauchten 5,1 ccm. Kalilauge (1 ccm. = 0,005808 g KHO) zur Neutralisation. Daraus berechnet sich ein mittleres Molekulargewicht von 266,2 für die aus den Seifen stammenden Fettsäuren, also ungefähr dasselbe, welches den Gesammtfettsäuren des Fettes (268,64) zukommt.

Ebenso stimmt das mittlere Molekulargewicht der freien Fettsäuren mit dem der Fettsäuren aus den Glyceriden überein, wie sich daraus ergibt, dass der aus der Säure- und Verseifungszahl des Fettes berechnete Gehalt an freien Fettsäuren (1,680%) identisch ist mit demjenigen, der sich unter der Annahme, dass die freien Fettsäuren dasselbe mittlere Molekulargewicht, wie die aus den Glyceriden haben, aus der Säurezahl allein berechnet (1,738%). Es sind also in den Seifen und den freien Fettsäuren des Chylus dieselben Fettsäuren in demselben Mengenverhältnisse, wie im Fett vertreten.

Glyceriden der Oel-, Stearin-, Palmitin- und Myristinsäure, von denen das Triolein den Hauptbestandtheil ausmacht. Das Tristearin beträgt das Dreifache des Tripalmitins, während Trimyristin nur in kleiner Menge, die Glyceride flüchtiger Fettsäuren nur in Spuren vorkommen. Das Chylusfett enthält ausserdem eine geringe Menge (1,68%) freier Fettsäuren, wie das auch Munk und Rosenstein angeben. Der Lecithin-gehalt desselben beträgt 0,56%, der Cholesteringehalt 1,715%, also erheblich verschiedene Werthe, als die obengenannten Autoren fanden. Es mag das mit der Qualität der Nahrung zusammenhängen.

Es ist vielleicht interessant, die über die Zusammensetzung des Fettes des menschlichen panniculus adiposus bekannten Daten mit den entsprechenden des Chylusfettes zu vergleichen.

L. Langer¹⁾ fand, dass das Gemenge der Fettsäuren aus dem flüssigen Fette des Erwachsenen

89,80% Oelsäure,

8,16% Palmitinsäure und

2,04% Stearinsäure

enthalte. Der Unterschied gegenüber dem Chylusfett besteht also darin, dass das Fett des panniculus oleinreicher und das Verhältniss des Palmitins zum Stearin verkehrt ist. Da das analysirte Chylusfett bei einer Nahrung gewonnen wurde, die mit den bei uns gebräuchlichen festen Fetten bereitet war, und der Patient dabei um 2 kg an Körpergewicht zunahm, die Nahrung also das zum Fettansatz nothwendige Material enthielt, so kann daraus direkt geschlossen werden, dass, wenn auch das Chylusfett in seiner Zusammensetzung vom Nahrungsfett abhängig ist (siehe oben), das als Reservematerial in den Fettzellen aufgespeicherte Fett von der chemischen Zusammensetzung des vom Darm resorbirten Fettes unabhängig ist; ein neuer Beweis also dafür, dass das Fett nicht einfach

¹⁾ Ueber die chemische Zusammensetzung des Menschenfettes in verschiedenen Lebensaltern. Sitzb. der K. Akademie der Wissenschaften in Wien, Bd. 84, 1881.

die Fettzelle gelange.

Wir haben endlich noch einen besonderen Befund zu erwähnen, nämlich das Monoxystearinsäurengemenge, das bei der Filtration des Harnfettes als im Fett ungelöst zurückblieb. Diese Verbindungen können künstlich aus der Oelsäure ($C_{18}H_{34}O_2$) erhalten werden (Geitel). Diese ungesättigte Säure liefert durch einfache Anlagerung von einem Molekül Wasser (H_2O) die Monoxystearinsäuren ($C_{18}H_{36}O_3$). Da in den als Nahrung verwendeten Fetten diese Oxysäuren nicht nachgewiesen wurden und jedenfalls, nach den Acetylzahlen dieser Fette zu schliessen, sicher nicht in solchen Mengen vorhanden sein können, so können wir nur annehmen, dass sie erst im Organismus offenbar aus der Oelsäure entstehen und zwar entweder im Darm durch Einwirkung von Fermenten oder Bakterien, oder aber in der Darmwand. Ich möchte das Erstere für das wahrscheinlichere halten, mich auf einen Befund Eberts¹⁾ stützend, der im Adipocire Oxymargarinsäure nachwies.

Da nach Allem, was wir heute über die Adipocirebildung wissen, das Leichenwachs aus dem in der Leiche vorhandenen Fette unzweifelhaft durch die Wirkung von Bakterien²⁾ entsteht — wenigstens fehlt für die Annahme einer anderen Entstehungsart jeglicher Anhaltspunkt —, so wird man wohl nicht fehlgehen, wenn man für die Oxysäure des Chylusfettes dieselbe Genese annimmt.

Zum Schlusse sei es mir noch gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Hofrath Prof. E. Ludwig, für manchen werthvollen Rath an dieser Stelle meinen besten Dank zu sagen.

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1875.

²⁾ Vergl. die jüngst erschienene Arbeit von Rubner. Ueber Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren im Boden und in Nährflüssigkeiten. Archiv für Hygiene, Bd. 38, Heft 1, 1900.

Ueber Proteinstoffe.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. technische Hochschule in Brünn.)

(Der Redaction zugegangen am 17. Juli 1900.)

I.

Vor fast dreissig Jahren haben H. Hlasiwetz und J. Habermann zwei Abhandlungen über die Proteinstoffe erscheinen lassen, von welchen die erste die Ergebnisse der Untersuchung der Spaltung der Eiweissstoffe unter der Einwirkung von Brom und Wasser, die zweite die Zersetzung dieser Körper durch Salzsäure bei Gegenwart von Zinnchlorür zum Gegenstande haben. In Fortsetzung dieser Untersuchung waren, wie heute, wenn auch verspätet, gesagt werden muss, bei der Publication der zweiten der citirten Abhandlungen Versuche im Gange, bei welchen die Proteinstoffe der Einwirkung von Aetzbaryt in wässriger Lösung ausgesetzt wurden.

Diese Versuche waren schon ziemlich weit vorgeschritten, als 1875 die erste Arbeit von P. Schützenberger erschien, welche den gleichen Gegenstand betraf.

In Folge dieser Publication Schützenberger's wurden die damals von H. Hlasiwetz und J. Habermann ermittelten Thatsachen nicht veröffentlicht, obwohl gesagt werden kann, dass die von den Genannten damals experimentell festgestellten Thatsachen nicht unerheblich von denen verschieden waren, welche Schützenberger mitgetheilt hat.

Schützenberger hat seine diesbezüglichen Publicationen im Jahre 1879 abgeschlossen und sind dieselben, insbeson-

theoretischen Betrachtungen, von verschiedenen Forschern zum Gegenstande mehr oder weniger eingehender Erörterungen und Bemerkungen gemacht worden. Die theoretischen Anschauungen Schützenberger's haben, wenn auch nicht ganz unwidersprochen, vielfach Zustimmung gefunden, und mit Rücksicht darauf, sowie in Hinblick auf die grosse Bedeutung, welche seine Lehre für die Deutung der Constitution der Eiweissstoffe erlangt hat, und welche, wie uns scheinen will, mit dem experimentellen Werthe seiner Untersuchungen nicht ganz im Einklange steht, und welche weiter, wie erwähnt, mit den experimentellen Resultaten, zu denen der Eine von uns vor Jahren gelangt ist, nicht ganz übereinstimmen, schien es uns an der Zeit, den Gegenstand neuerdings aufzunehmen und die Arbeiten Schützenberger's vor Allem einer Ueberprüfung zu unterziehen.

Bevor wir nun die Resultate unserer diesbezüglichen Untersuchungen mittheilen, wird es zweckmässig sein, aus den Arbeiten Schützenberger's das Wesentlichste in Erinnerung zu bringen.

Die Einwirkung des Barythydrates auf Eiweissstoffe wurde zuerst von Theile¹⁾ im Jahre 1867 und sodann von Nasse²⁾ im Jahre 1872 studirt. Die Arbeiten Schützenberger's sind indessen die ersten, welche den Gegenstand, wenigstens dem Anscheine nach, mit einer Gründlichkeit erschöpfen, die weitere Arbeiten in gleicher Richtung für die Folge überflüssig erscheinen liess. Die eben citirten deutschen Autoren, die zuerst den Weg betraten, auf welchem ihnen der französische Forscher späterhin folgen sollte, hatten sich vorerst nur zum Ziele gesetzt, die bei der Einwirkung von Alkalien auf Protein-stoffe entstehenden Mengen von Ammoniak und Kohlensäure einem genauen, quantitativen Studium zu unterziehen. Beiden, und namentlich Nasse, war die Idee vorgeschwebt, auf diesem

1) Chemisches Centralblatt 1867, S. 385.

2) Pflüger's Archiv f. Physiologie, Bd. 6, 7, 8.

des Eiweissmoleküles zu gewinnen. Und nun hat sich bezeichnender Weise weder Theile noch Nasse zu so weitgehenden Folgerungen bestimmt gefunden, um aus den gewonnenen Analysenzahlen ein so ziemlich complettes Bild über den Aufbau des Eiweissmoleküles zu construiren, wie es Schützenberger gethan hatte. Er allein unternahm es, aus den Resultaten seiner Analysen eine Theorie aufzubauen, welche bis auf den heutigen Tag ihren gewichtigen Platz unter den Constitutionsthesen beibehalten hat und in allen grösseren Lehrbüchern der physiologischen Chemie an erster Stelle figurirt. Diese Theorie ist bekannt. Auf dem Mengenverhältnisse der Oxalsäure, der Kohlensäure und des Ammoniaks aufgebaut, die sich alle bei der Einwirkung von Barythydrat auf die Proteinstoffe entwickeln, gewährt sie einem wenig kritischen Auge einen anscheinend frappanten Einblick in die Constitutionsverhältnisse des Eiweisskerns. Sie besagt in Kurzem, dass sich die drei genannten Körper in einem Mengenverhältnisse entwickeln, das die Zerlegung der Harnstoffgruppe einerseits und der Oxamidgruppe andererseits zur Voraussetzung hat. Beide Gruppen müssen also nach seiner Anschauung im Eiweissmolekül präformirt sein.

Gehen wir nun auf die Entstehungsgeschichte dieser Theorie des Näheren ein. Verfolgen wir sie Schritt für Schritt in der chronologischen Aufeinanderfolge der einzelnen Publicationen, wobei wir uns stets vor Augen halten, dass die Oxalsäure, die Kohlensäure und das Ammoniak in ihrem relativen Mengenverhältnisse gewissermassen die drei Grundpfeiler sind, auf welchen sich das Schützenberger'sche Lehrgebäude aufbaut.

Die erste Publication erfolgte im Band XXIII der *Bulletins de la Société chimique de Paris*. Auf Seite 193 lesen wir daselbst: «M. Schützenberger communique à la Société la suite de ses recherches sur l'albumine. (Die ersten Arbeiten beziehen sich auf die Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure auf Albumin.) D'après les resultats obtenus l'albumine se dédouble par l'hydrate de baryte en ammoniacque, carbonate

Der Oxalsäure wird also in dieser Notiz noch keine Erwähnung gethan. Wohl aber im Folgenden. Auf Seite 216 und ff. berichtet Schützenberger über eine Zersetzung von 100 g coagulirtem Albumin mit 200 g Barythydrat durch Kochen am Rückflusskühler, wobei er einen unlöslichen Rückstand erhält, den er folgendermassen beschreibt: «Il était formé principalement de carbonate de baryte, mélangé à un peu d'oxalate, de sulfite de baryte, à des phosphates alcalino-terreux et à de la silice provenant de l'attaque du verre pendant cette longue ébullition.» Dieser «Précipité insoluble» wird auch für unsere weiteren Darlegungen von grösster Wichtigkeit sein. Es sei daher ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Oxalsäure nun zum ersten Male auf den Plan tritt, wenn auch nur in spurenweiser Menge.

Wichtigkeit scheint uns aber der Umstand, dass Schützenberger sich mit der Erwähnung begnügt, die Oxalsäure sei in kleinen Mengen dem unlöslichen Rückstande beigemengt, und bei der quantitativen Analyse des Rückstandes sie ruhig ihrem Schicksale überlässt. Was folgt daraus? Zieht man in Betracht, dass von einer eingehenden, qualitativen Prüfung des unlöslichen Rückstandes an keiner Stelle der sämtlichen Schützenberger'schen Abhandlungen die Rede ist, so kann man sich des Gedankens nicht erwehren, dass er sich kaum die Mühe genommen haben dürfte, seine Oxalsäure im freien Zustand oder in Form ihres Calciumsalzes abzuscheiden und weiter zu prüfen. Er wäre dann wahrscheinlich zu anderen Ergebnissen gelangt. Im positiven Theil dieser Abhandlung mag dann weiterhin noch die Rede davon sein.

Verfolgen wir den von Schützenberger eingeschlagenen Weg nun weiter. «Si l'on suppose», so berichtet Schützenberger weiter, «que l'ammoniaque et l'acide carbonique proviennent du dédoublement du groupement de l'urée contenu dans l'albumine on aurait dû trouver pour 1,7 g d'ammoniaque 9,85 de carbonate de baryte.» Damit ist nun die späterhin zu entwickelnde Theorie in ihren Grundzügen angedeutet. Interessant ist jedenfalls der Umstand, dass für Schützenberger's Arbeiten a priori die Idee der Anwesenheit der Harnstoffgruppe im Eiweissmolekül Richtung gebend ist.

Schützenberger berichtet nun weiter über eine Reihe von Aufschliessungen des Albumins mittelst Barythydrats im geschlossenen Cylinder, von denen eine jede durch mehrere Tage, selbst durch eine Woche bei einer Temperatur von 150° fortgesetzt worden war. Er findet die Oxalsäure wiederum nur in Spuren dem unlöslichen Rückstande beigemengt, während dieser fast ausschliesslich aus Baryumcarbonat zusammengesetzt ist. Ammoniak und kohlenaurer Baryt müssen nun in dem Verhältnisse stehen, wie es die Zersetzung der Harnstoffgruppe erfordert. Die Menge des Baryumcarbonats weicht aber thatsächlich um 3—4% von derjenigen Menge ab, die nach dem Maassstabe der Zersetzung der Harnstoffgruppe be-

ser Versuchsreihe den un-
kohlensäurefreiem Wasser
ngaben macht er darüber
ec soin, a été bien, lavé
bonique.» Und weiter:
idu insoluble resté sur
e carbonate de baryte,
. 20 g.»

eses auffällige Manco
uss an Ammoniak?
expériences le poids
peu plus fort par
récipité, que celui

ii paraît probable
en petite quantité,
l'ammoniaque,
t de la taurine,

abres trouvés
ue l'albumine
e complexe.»
en zur Auf-
n, um ein
stehen im
ensetzung

§: «Des
eroyons
antes:
ments
ab-
la
ne,
l'à
le

composition. La molécule de l'albumine contient en outre une petite proportion d'une amide cellulosique. Ces divers produits représentent à très peu de chose près seuls, les dérivés formés par hydratation au dépens de l'albumine.»

Wir verlassen nun den Band XXIII der Bulletins, nachdem wir von einer Notiz auf Seite 385 Kenntniss genommen haben, die für die Folge von Wichtigkeit ist und auch ihr scharfes Licht auf die eben besprochene Arbeit wirft. Sie lautet in ihrem für unsere Zwecke massgebenden Theile folgenderweise: «Il (Schützenberger) a aussi reconnu que certaines albumines fournissent beaucoup plus d'oxalate de baryum que d'autres, lorsqu'on les hydrate par la baryte. Cependant le rapport entre l'ammoniaque dégagée et la baryte précipitée sous forme d'oxalate et de carbonate, ne varie pas sensiblement dans ce cas; il en résulte que le groupement de l'oxamide peut remplacer plus ou moins le groupement de l'urée.»

Hierdurch ist die erste, grosse Arbeit Schützenberger's genügend gekennzeichnet, und es scheint uns nun nothwendig, an die Kennzeichnung der zweiten heranzutreten, die im Band XXIV der Bulletins de la Société chimique de Paris enthalten ist. Auf Seite 4 dieses Bandes berichtet Schützenberger nun nochmals, dass gewisse Albuminsorten, «certaines échantillons d'albumine», bei der Aufschliessung einen unlöslichen Rückstand liefern, welcher, anstatt fast ausschliesslich aus Baryumcarbonat, vermengt mit Spuren von Oxalat und Sulfit, zusammengesetzt zu sein, sich aus fast gleichen Theilen Baryumcarbonat und Oxalat zusammengesetzt fand, ein Umstand, der wohl der allgemeinen Fassung, welche Schützenberger den Ergebnissen seiner Arbeit verleiht, einigermaßen zuwiderläuft.

Nachdem nun einmal die Oxalsäure sich über das Niveau der «quantité négligeable» erhoben hat und zum integrierenden Bestandtheil der «données fondamentales», wie der französische Forscher die Ergebnisse seiner Arbeit betitelt, geworden ist, legt er sich die Verhältnisse nun so zurecht, dass er die

dem C_2O_4Ba theoretisch entspricht, berechnet, beide Mengen addirt und nun die Summe mit der thatsächlich gefundenen Ammoniakmenge in Vergleich setzt. Eine ganze Reihe von Eiweissstoffen, welche der Behandlung mit Aetzbaryt unterworfen worden waren, lieferten so für das Ammoniak Zahlen, welche von der theoretisch berechneten Menge um 0,2—0,5% im Durchschnitt abweichen.

Den beiden Arbeiten, die nun nach einer speciellen Richtung hin des Eingehenden beleuchtet worden sind, folgte im Jahre 1879 eine weitere, auf viel breiterer Basis aufgebaute Arbeit. Sie findet sich in den *Annales de Chimie et de Physique* XVI, V. Série. Im Wesentlichen bietet sie für unsere Zwecke nichts mehr Neues. Schützenberger hat das Versprechen, das er am Ende seiner zweiten Arbeit gibt: die Analysen auf der Grundlage der grössten Genauigkeit zu wiederholen, um scharfe und bestimmte Zahlen angeben zu können, einzulösen versucht. Die Resultate einer stattlichen Zahl von Aufschliessungen, die unter wechselnden Bedingungen, was Zeit, Temperatur und Menge des aufschliessenden Agens anlangen, durchgeführt worden waren, werden nun der Discussion unterzogen. Dabei stösst Schützenberger wiederum auf einen Punkt, der ihm bereits in der ersten Arbeit (Band XXIII der *Bulletins*) aufgefallen ist. Es ist die Menge Ammoniak, deren Entwicklung mit der Entbindung von Kohlen- und Oxalsäure durchaus nicht Schritt hält, vielmehr die letzteren bei Weitem überflügelt. Welche Bedeutung gab Schützenberger dieser auffallenden Thatsache im Band XXIII der *Bulletins*? Wie erinnerlich, sagte er dort: «que l'albumine renferme, en petite quantité des groupements susceptibles de dégager de l'ammoniaque (groupement de la taurine, groupement d'une amide cellulosique).» Diesen Standpunkt hat er in den *Annales* verlassen und mit einem Sprung den folgenden gewonnen: «On explique tous ces résultats en admettant que la molécule d'albumine renferme un groupement oxamide et un autre carbamide. L'oxamide se scinderait d'abord, en perdant la moitié de son azote et en laissant un groupement oxamique, puis la

niaque, en même temps qu'une petite fraction du groupement oxamique. La température étant plus élevée, celui-ci se transformerait, à son tour, en ammoniacque et acide oxalique dont une partie se séparerait de suite et dont une autre resterait unie ou copulée aux composés du résidu fixe. Ce n'est que sous l'influence d'une action plus énergique que la majeure partie et le reste de l'acide oxalique apparaissent en liberté.» Uns will scheinen, dass diese Sätze keine genügend einwandfreie Erklärung der experimentell festgestellten Thatsachen bilden und kaum ausreichen, um die Theorie Schützenberger's über die Constitution der Eiweissstoffe mit einiger Sicherheit zu stützen. Dass diese unsere Anschauung keine unbegründete ist, dafür mag als Beweis das Urtheil Drechsel's herangezogen werden, der sich darüber im Ladenburg'schen Handwörterbuch der Chemie III, S. 544, folgendermassen äussert: «Die Menge des Ammoniaks beträgt Anfangs mehr als zwei Moleküle auf je ein Molekül Kohlensäure und Oxalsäure, in der III. Gleichung etwas weniger, ein Verhältniss, wie wir es auch bei der Zersetzung des Harnstoffs und des Oxamids kennen; doch darf hieraus noch nicht geschlossen werden, dass das Eiweiss ein complexes Ureid oder Oxamid sei, da alle Bemühungen, diese letzteren daraus zu erhalten, bisher gescheitert sind, da ferner die Abspaltung des Ammoniaks der Bildung von Kohlensäure und Oxalsäure durchaus nicht parallel geht, und endlich im fixen Rückstand Verbindungen vorkommen, welche bei der Zersetzung mit Kalihydrat Oxalsäure liefern, aber wahrscheinlich nicht dem Oxamid, sondern der Hippursäure analog constituit sind.

Bevor wir nun die Besprechung der Schützenberger'schen Publicationen schliessen, seien noch einige Worte der direkten Bestimmung der Kohlensäure gewidmet, wie sie Schützenberger in den Annales angibt. Er sagt: «Dans le dépôt de sels barytiques insolubles, on a dosé l'acide carbonique par le procédé ordinaire, c'est-à-dire en décomposant un poids connu du dépôt par l'acide chlorhydrique dans l'appareil usité, et en pesant la perte due au dégagement d'acide carbonique.»

Sulfit-, kohlensaure Salze und regelmässig auch Sulfide enthält, so wird man leicht zugeben, dass diese Methode, die Kohlensäure zu bestimmen, im vorliegenden Falle keine verlässlichen Resultate liefern kann.

Die vorstehende Uebersicht über den Entwicklungsgang, den die Schützenberger'sche Theorie genommen hat, wird genügen, um die widerspruchsvollen Züge aufzudecken, an denen das Bild krankt, das uns der französische Forscher von dem Bau des Eiweissmoleküls gezeichnet hat. Nicht die That-sache allein, dass es bisher nicht gelungen sei, den Harnstoff unmittelbar aus den Eiweisskörpern abzuspalten, bringt die Theorie Schützenberger's ins Schwanken, es ist vielmehr die zum Theil experimentelle Unvollkommenheit seiner Arbeiten, die den Gedanken wachruft, dass seine Theorie zum Theile gewaltsam in die Analysenresultate hineininterpretirt ist. Und der Vorwurf der experimentellen Unvollkommenheit trifft, wie wir glauben, vor Allem die Anwendung des Barythydrates als Aufschliessungsmittel, welches die genaue, quantitative Bestimmung der Kohlensäure, des Ammoniaks und der Oxalsäure sehr erschwert, wenn nicht unmöglich macht, was aus dem folgenden, positiven Theile dieser unserer Darlegungen hervor-gehen dürfte.

Zweck und Ziel unserer positiven Arbeit schien uns klar vorgezeichnet. Es galt, die Schützenberger'schen Versuche im kleinen Massstabe so durchzuführen, dass thunlichst einwandfreie und exacte Resultate in den gewonnenen Zahlen zum Ausdrucke gelangen sollten. Die Körper, welche der Aufschliessung mittelst Aetzbaryt unterworfen wurden, waren Eialbumin und Casein. Nachdem Vorversuche, die Aufschliessung im Schiessrohre vorzunehmen, mit negativem Resultate geendigt hatten, da einerseits die Röhren zu häufig sprangen und andererseits die Aufschliessung nur sehr unvollkommen vor sich ging, wurde die Operation in einem Digestor aus Phosphorbronze mit verzinnten Innenwandungen vorgenommen, der genau nach den Angaben, die Schützenberger von seinem Aufschliessungscyliner in den Annales

entsprach. In diesem vollig gasdicht geschlossenen Bronzedigestor wurde das aufzuschliessende Material, nachdem es im Vacuumtrockenapparate in thunlichst zerkleinertem Zustande bis zur Gewichtsconstanz getrocknet worden war, mittelst Baryhydratlösung durch 12 Stunden bei 100° erhitzt. Der Aetzbaryt wurde jedesmal in der doppelten Menge des aufzuschliessenden Materials im kochenden Wasser gelöst und die Lösung in den Digestor heiss hineinfiltrirt. Zunächst sollte die entwickelte Ammoniak- und Kohlensäuremenge einer näheren Untersuchung unterzogen werden. Der Bronzedigestor wurde nach beendigter Operation mittelst einer Kältemischung von Schnee und Kochsalz auf eine Temperatur gebracht, bei welcher ein Entweichen von Ammoniak, wie es beim Oeffnen des Gefässes zu befürchten stand, möglichst ausgeschlossen erschien. Der Inhalt des Digestors wurde nun rasch in einen Erlenmeyer-Kolben mit aufgesetztem Trichter geleert und am Liebig'schen Kühler die Destillation des Ammoniaks sofort vorgenommen. Als Absorptionsflüssigkeit diente eine halb normale Schwefelsäure, als Indicator bei der folgenden Titration Methylorange. Zu erwähnen wäre, dass die titrirte Schwefelsäure mit der fortschreitenden Destillation einen intensiven Geruch annahm, der etwa an den des angebrannten Leims erinnerte, dabei aber stets klar blieb.

Die Destillation war jedesmal so weit getrieben worden, dass das Flüssigkeitsvolumen im Kochkolben sich etwa um zwei Dritttheile vermindert hatte. Nun wurde das Absorptionsgefäss entfernt und der Kühler luftdicht mit einem Natronkalkrohr in Verbindung gesetzt, so dass der Flüssigkeitsrest im Erlenmeyer-Kolben unter völligem Abschluss der atmosphärischen Kohlensäure erkalten konnte. Die Bestimmung der Kohlensäure wurde nun auf direkte Weise vorgenommen, so dass sie im Liebig'schen Kaliapparate aufgefangen wurde. Der gesammte Apparat hierzu bestand neben dem üblichen, aufsteigenden Kühler aus einer Waschflasche mit concentrirter Schwefelsäure gefüllt, hierauf folgte eine Waschflasche mit Kaliumpermanganatlösung, dann nochmals eine Waschflasche

vitriolbimsstein, an welches sich der Kaliapparat anschloss. Den Schluss bildete, wie gewöhnlich, ein Natronkalkrohr. Zu diesen besonderen Vorsichtsmassregeln bewog uns einerseits die Befürchtung, dass flüchtige organische Produkte, sowie Schwefelwasserstoff und schweflige Säure in den Kaliapparat gelangen könnten, andererseits musste ja neben Baryum, statt der üblichen Schwefelsäure, Salzsäure als Kohlensäure entbindendes Agens angewendet werden, daher das Kupfervitriolbimssteinrohr nicht entbehrlich war. Thatsächlich überzeugte uns auch der Augenschein, dass unsere Befürchtungen wohl begründet waren. Die erste Waschflasche, welche concentrirte Schwefelsäure enthielt, war nach durchgeführter Operation vollständig mit Schwefel erfüllt, der von der Zersetzung des entbundenen Schwefelwasserstoffes herrührte, und wies einen Geruch auf, der an schwere Kohlenwasserstoffe erinnerte. Die zweite Waschflasche (Kaliumpermanganatlösung) hatte einen reichlichen Niederschlag von Mangandioxyd aufzuweisen, die concentrirte Schwefelsäure der dritten Waschflasche jedoch war in allen Versuchsfällen klar geblieben. Der Nachtheil, den dieses Waschflaschensystem der Genauigkeit der Bestimmung dadurch zufügen konnte, dass die Kohlensäure in dem so gebildeten schädlichen Raume in empfindlichem Maasse vielleicht zurückgehalten wurde, war durch eine gründliche Lüftung mittelst eines Gasometers wett zu machen gesucht worden.

Die folgende Tabelle bringt eine Zusammenstellung der Resultate.

	Angewandte Substanzmenge	NH ₃	CO ₂
1.	7,1902 g	2,75 %	1,30 %
2.	13,7408 g	2,88 %	0,88 %
3.	7,4581 g	3,10 %	1,59 %
4.	9,2846 g	3,01 %	0,97 %

} Casein

	Angewandte Substanzmenge	NH ₃	CO ₂
1.	7,1902 g	3,33 %	1,74 %
2.	6,9774 g	2,72 %	1,51 %
3.	2,4116 g	3,26 %	—
4.	6,0088 g	2,84 %	—
5.	6,0544 g	2,86 %	1,38 %

Eieralbumin

In dieser Tabelle — es lehrt dies wohl der erste Blick — ist das Beweismaterial aufgestapelt für die Behauptung, dass die Einwirkung des Barythydrats auf das Eiweiss keine gleichmässige ist, wenigstens unter den Versuchsbedingungen, wie sie, analog denen Schützenbergers, in unserem Falle gegeben waren. Die ganz bedeutenden Differenzen in den Resultaten, namentlich in denen der Kohlensäure, können nur auf diesem Wege und keinem anderen ihre Erklärung finden. Schon Nasse macht eine kurze Andeutung über diesen unregelmässigen Reactionsverlauf. Auf Seite 593 des Pflüger'schen Archivs, Bd. VI, sagt er hierüber: «Weiter können zu geringe Werthe von Q (bekanntlich des in Form von Ammoniak ausgeschiedenen Stickstoffs zum Gesamtstickstoff des untersuchten Eiweisskörpers) entstehen dadurch, dass kleine Partien der Eiweissstoffe an den von der Flüssigkeit nicht benetzten Wänden der Retorte hängen bleiben, oder auch wohl kleine Klümpchen sich mit einer undurchdringlichen Hülle von kohlensaurem Baryt überziehen, und so die inneren Theile der Einwirkung des Barythydrats entzogen werden. . . .» Dieser Befürchtung möchten wir vielleicht nicht unbegründeter Weise noch hinzufügen, dass unter gewissen Umständen theilweise eine unlösliche Baryumeiweissverbindung entsteht, denn der unlösliche Rückstand hatte in jedem Falle eine schmierige Beschaffenheit, selbst nach dem sorgfältigsten Auswaschen bis zum Verschwinden der Baryumreaction, oft war er von Klumpen durchsetzt, und in einem Falle bildete der gesammte Rückstand einer Caseinaufschliessung sogar ein kompaktes, seifenartiges Stück. Zwei genau übereinstimmende Resultate zu erzielen,

engen von 100 g lufttrockenem
rger anzuwenden pflegt, um so
der Hand.

ie Bestimmung der Oxalsäure
e in der Flüssigkeit zu fällen,
Kohlensäure zurückgeblieben
diese Flüssigkeit, ursprüng-
dem Einflusse der Salzsäure
schwarz gefärbt; entweder
ydirenden Einfluss der Luft
reten, oder es hatte der
das Zinn, welches von
nnen konnte, in Form
wurden daher separate
xalsäure zu bestimmen.

dass der unlösliche
it einer Sodalösung
vom Filter herunter-
und das Filtrat mit
die Oxalsäure mit
erhaltene Nieder-
gekocht und die
lt. Der Nieder-
t und als CaO
e je eine Be-
geführt. Die

0.

0.

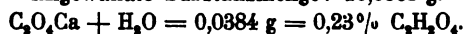
hützen-
in unter
g, ent-
aber
ossen

erscheinen, dass das Aussehen des Niederschlages und die Schwierigkeit seiner Isolirung von beigemengten, dunkel gefärbten, organischen Substanzen, sowie das Schäumen der nie ganz klar zu bekommenden Flüssigkeit, in welcher die Oxalsäure zur Fällung gebracht werden musste, dass alle diese Umstände in uns den Wunsch rege machten, einmal die Oxalsäure thatsächlich zu Gesicht zu bekommen. Und dieser Wunsch brachte uns in der Folge auf ein sehr merkwürdiges Resultat. Wir fanden nämlich, dass der Niederschlag, der als oxalsaurer Kalk angesprochen worden war, bei einer qualitativen Prüfung nur sehr geringe Mengen, ja fast nur Spuren von Oxalsäure enthält.

Diese qualitative Prüfung wurde folgendermassen vorgenommen: Der unlösliche Rückstand von der Aufschliessung wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, abfiltrirt und das Filtrat mit Petroläther, der aus dem käuflichen, durch fractionirte Destillation unter 60° gewonnen worden war, gut ausgeschüttelt, um etwa vorhandene Fettsäuren in Lösung zu bringen. (Da keinerlei Litteraturangaben über die Löslichkeitsverhältnisse der Oxalsäure in Petroläther aufzufinden waren, wurde in einem aliquoten Antheile einer circa normalen Oxalsäurelösung der Gehalt an $C_2H_2O_4$ durch Titration mittelst einer gestellten n-Kalilauge festgestellt und hierauf ein zweiter aliquoter Antheil mit Petroläther von der gleichen Qualität durch längere Zeit und wiederholt ausgeschüttelt. Der Oxalsäuregehalt hatte sich dadurch — wie die nun folgende Titration zeigte — um nichts verändert. Die Oxalsäure ist daher im Petroläther als unlöslich zu betrachten, was auch durch weitere, analog geführte Versuche bestätigt wurde). Das mit Petroläther gründlich ausgeschüttelte Filtrat wurde nun mit Ammoniak neutralisirt, Essigsäure im Ueberschuss hinzugesetzt und die vermeintliche Oxalsäure durch Chlorcalciumlösung gefällt, der Niederschlag nochmals in Salzsäure gelöst und wiederum gefällt. Der nun resultirende Niederschlag wurde auf einem tarirten Filter gesammelt, bis zum Verschwinden der Salzsäurereaction gewaschen und bei 100° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet.

sultat:

Angewandte Substanzmenge: 10,0563 g.



Dieser als oxalsaurer Kalk gewogene Niederschlag wurde nunmehr in Salzsäure gelöst und durch Schütteln mit reichlichen Mengen von Aether, der sorgfältig gereinigt war, die Oxalsäure zu extrahieren versucht. Hierbei wurden, wie bereits erwähnt, stets nur sehr geringe Mengen, ja fast nur Spuren von Oxalsäure in Substanz abgeschieden. Selbst der unlösliche Aufschliessungsrückstand von je 100 g Casein und Albumin lieferte nach dem gleichen Verfahren nur Spuren von Oxalsäure.

Um punkto Löslichkeit der Oxalsäure in Aether völlige Klarheit zu schaffen, wurden analoge Versuche durchgeführt, wie sie früher betreffs der Unlöslichkeit der Oxalsäure in Petroläther unternommen worden waren. Hierbei zeigte sich, dass beim Wiederholen des Ausschüttelns mit Aether die Mengen der Oxalsäure in der wässerigen Lösung rasch um Vieles geringer wurden, ohne dass es jedoch gelang, die Oxalsäure der wässerigen Lösung durch Aether vollständig zu entziehen. Kann demnach gegen diese Methode, auf Oxalsäure zu prüfen, auch eingewendet werden, dass die Oxalsäure nur schwer und nur zum Theil in den Aether übergeht, so beweist sie doch mit hinlänglicher Sicherheit, dass es sich in jedem Falle doch nur um geringe Mengen von Oxalsäure handeln kann und diese Mengen ganz erheblich hinter jenen zurückbleiben, welche Schützenberger angibt.

II.

Im ersten Theile dieser Abhandlung hatten wir an der Zahlentabelle, welche uns die quantitativen Aufschliessungen der Eiweissstoffe mittels Barythydrats geliefert hatten, die Thatsache illustriert, dass im Einklange mit den Beobachtungen, die schon Nasse gemacht hatte, der Aetzbaryt ein für quantitative Untersuchungen der Eiweissstoffe nicht geeignetes Zersetzungsmaterial sei. Selbst die bekannte Annahme, dass der Aetzbaryt beim Abdestilliren der Zersetzungsflüssig-

weiteren Zerfall von Amidokörpern bewirke, könnte kaum ausreichen, um die bedeutenden Differenzen in den Ammoniakresultaten zu erklären, abgesehen von den überaus auffälligen Abweichungen in den Resultaten der Kohlensäurebestimmungen. Resultate von befriedigender Uebereinstimmung waren demnach mit seiner Hülfe nicht zu erzielen. Und so wurde denn das Kalihydrat zur Aufschliessung herangezogen, um die Grundlagen der Schützenberger'schen Theorie, d. i. die Menge an Ammoniak, Kohlen- und Oxalsäure, wie sie sich bei der alkalischen Spaltung der Eiweissstoffe entwickeln, einem näheren Studium unterwerfen zu können.

Die Anordnung der zu diesem Zwecke durchgeführten Versuche war in der Weise getroffen worden, dass zur Bestimmung eines jeden dieser drei Körper eine separate Aufschliessung vorgenommen wurde. Ca. 3 g Casein¹⁾ wurden mit 300 ccm. einer 10%igen Kalilauge in einem Erlenmeyer-Kolben durch zwölf Stunden am Rückflusskühler mit Hülfe eines Wasserbades erhitzt, und das Ammoniak sodann am umgelegten Kühler abdestillirt. Zur Vermeidung eines jeden Verlustes an Ammoniak trug der Rückflusskühler einen Schrötterschen Exsiccatorenaufsatz, der 5 ccm. einer genau titrirten, halbnormalen Schwefelsäure enthielt. Das Abdestilliren des Ammoniaks wurde in jedem Falle so weit getrieben, dass der Boden des Kolbens nur von einer dünnen Flüssigkeitsschichte noch bedeckt war, und ein weiteres Erhitzen die Integrität des Kolbens jedenfalls gefährdet hätte. Als Absorptionsflüssigkeit diente wie in den früheren Fällen eine halb normale Schwefelsäure, als Indicator Methylorange. Nicht unerwähnt soll bleiben, dass die $\frac{n}{2}$ Schwefelsäure, wie bei den Operationen mit Barythydrat, einen intensiven, unangenehmen Geruch erlangte sowie, die Absorption des Ammoniaks

1) Da es sich in diesem Falle nur um Verhältnisszahlen handelte, wurde das zeitraubende Trocknen des Caseins bis zur Gewichtsconstanz weggelassen, obzwar es im ersten Theil der Arbeit vorgenommen worden war.

Uebereinstimmung gleich nacheinander erzielt¹⁾:

Angewandte Substanzmenge Casein:

NH₃

1. 3,0074 g

3,58%

2. 3,0116 g

3,43%.

Zur Kohlensäurebestimmung wurden ca. 10 g lufttrockenen Caseins mit 200 ccm. einer 50%igen Kalilauge durch 12 Stunden am Wasserbade in einem Erlenmeyer-Kolben erhitzt, der ein Bunsen'sches Ventil trug, um den Zutritt der atmosphärischen Kohlensäure abzuhalten. Die Kohlensäure wurde sodann mit derselben Apparatur wie im ersten Theile unserer Arbeit direkt bestimmt; vorher war jedoch der Kohlensäuregehalt der Zersetzungslauge auf genau dieselbe Weise ermittelt worden. Auch geschah die Entnahme der Kalilauge mittelst einer Hebevorrichtung, wie sie bei Flaschen, deren Inhalt vor dem Zutritt der atmosphärischen Kohlensäure geschützt werden soll, als Verschluss üblich ist. Zur Entbindung der Kohlensäure wurde an Stelle der früheren Salzsäure nun Schwefelsäure verwendet, wodurch das U-Rohr, mit Kupfervitriol-Bimsstein gefüllt, entbehrlich geworden war, und der Liebig'sche Kaliapparat seinen Anschluss direkt an die zweite Waschflasche mit concentrirter Schwefelsäure erhielt. Es resultirten folgende zwei Zahlen:

Angewandte Substanzmenge Casein:

CO₂

1. 9,9932 g

1,02%

2. 9,9986 g

1,08%

Es erübrigt nun mehr noch, die Bestimmung der Oxalsäure zu besprechen. 10 g lufttrockenes Casein wurden mit 200 ccm. einer 50%igen Kalilauge durch 12 Stunden am Wasserbade erhitzt, nach dem Abkühlen mit verdünnter Salzsäure neutralisirt, mit Ammoniak versetzt, erwärmt und vom entstandenen Niederschlag, der sich hauptsächlich aus der Kieselsäure des Kolbenglases zusammensetzte, abfiltrirt. Nun wurde Essigsäure im Ueberschuss hinzugefügt und die

1) Es ist von Interesse, dass die Ammoniakresultate, welche Hausmann durch eine Säurespaltung des Caseins erhält, viel niedriger sind. (Siehe Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. XXIX.)

Niederschlag nach dem Abfiltriren in verdünnter Salzsäure neuerlich gelöst und die Lösung mit Petroläther, der aus dem käuflichen durch fractionirte Destillation bei 60° gewonnen worden war, mehreremale ausgeschüttelt. Hierbei zeigte sich, dass der Petroläther gegenüber den organischen Verunreinigungen, welche die Flüssigkeit dunkel färbten, als Extractivmittel wirkte, denn die Flüssigkeit hatte nach dem Ausschütteln stets eine klare, weingelbe Farbe. Nun wurde die freie Salzsäure durch Ammoniak abgestumpft, das Ganze mit Essigsäure versetzt und durch Chlorcalcium die Oxalsäure in der Hitze zu fällen versucht. Der angestrebte Zweck wurde jedoch in keinem der wiederholten Fälle erreicht; die Flüssigkeit trübte sich zwar auf den Zusatz des Chlorcalciums, oder sie liess auch sofort einen flockigen, schmutzig braun gefärbten Niederschlag fallen, wurde aber weiter erhitzt, so trat an Stelle des erstrebten Körnigwerdens des Niederschlages ein Verkohlen desselben ein, und dies bei einer Temperatur, die unter der Kochhitze der Flüssigkeit lag und nur ein allmähliches Verdunsten des Wassers zu bewirken im Stande war. Von der quantitativen Bestimmung der Oxalsäure konnte also auf keinen Fall die Rede sein. Es war vielmehr eine organische, schmierige Kalkverbindung, die zum Herausfallen gebracht worden war. Ebenso wenig kann beim Zersetzen des Caseins durch Kalilauge von einem Auftreten der Oxalsäure in bemerkenswerther Menge die Rede sein; ihre Bildung kann höchstens spurenweise vor sich gehen.

Angesichts dieser Thatsache müssen wir nun auf das Verhältniss zwischen der Menge an Kohlensäure und Ammoniak, wie sie sich bei der Spaltung des Caseins durch Kalilauge bilden, zurückgreifen. Im Harnstoff beträgt dieses Verhältniss 1,28 ($\frac{\text{CO}_2}{2\text{NH}_4}$). In unserem Falle sind 0,28 und 9,31 die betreffenden Verhältnisszahlen, welche uns einen Fingerzeig über das Vorkommen der Harnstoffgruppe im Eiweissmolekül geben sollen. Dass sie diese Aufgabe nicht erfüllen, tritt augenscheinlich zu Tage.

Harnstoff und Eiweissmolekül in ihrem wechselseitigen

in Folge seines hohen, nicht nur chemischen, sondern auch physiologischen Interesses eine Reihe Forscher, von Béchamp bis Drechsel lebhaft beschäftigte. Wir haben uns bemüht, unseren bescheidenen Antheil zur Lösung dieser Frage insofern beizutragen, als wir den Werdegang der Theorie Schützenberger's klar zu beleuchten versuchten und die Sonde der Prüfung an die Zuverlässigkeit jener Zahlen legten, welche das Material zum Aufbau des Schützenberger'schen Lehrgebäudes bildeten. Auf Grund dieser Prüfung war es uns jedoch unmöglich, einen genauen, quantitativen Ausdruck für das Vorhandensein der Harnstoffgruppe im Eiweissmoleküle zu gewinnen. Weder gelang dies mit Hülfe der Zersetzungsprodukte, wie sie durch Einwirkung von Barythydrat auf Proteinstoffe entstehen, noch durch das Studium der Spaltung des Complexes mit Hülfe von Kalilauge. Namentlich in diesem letzteren Falle war das Verhältniss von Kohlensäure zu Ammoniak ein von der theoretischen Grösse nur allzu weit entferntes. Oxalsäure hatte sich in beiden Fällen höchstens nur spurenweise gebildet, ein Umstand, der mit der Annahme Schützenberger's über das Vorhandensein der Oxamidgruppe im Eiweisskerne nicht im Einklange steht.

Unsere nächste Aufgabe soll es nun sein, die übrigen Spaltungsprodukte des Eiweisskernes, wie sie sich bei der Zersetzung durch Alkalilaugen bilden, zu isoliren und einem näheren Studium zu unterwerfen, wobei die interessanten Glycoproteide Schützenberger's nicht ausser acht gelassen werden sollen.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)(Der Redaction zugegangen am 29. Juli 1900.)

Im Jahre 1893 machte A. Kossel²⁾ die Beobachtung, dass die Nucleinsäure im Stande ist, sich mit einer gewissen Menge von Adenin, Hypoxanthin oder anderen Purinbasen, welche ihrer Lösung zugefügt werden, zu vereinigen. Fügt man zu einer Nucleinsäurelösung eine kleine Menge dieser Basen hinzu, so werden dieselben durch die Nucleinsäure in einen Zustand übergeführt, in dem sie gewisse Fällungsreactionen, die ihnen im freien Zustand zukommen, eingebüsst haben; sie sind z. B. durch ammoniakalische Silberlösung nicht mehr fällbar. Nachdem A. Kossel sodann in Gemeinschaft mit A. Neumann durch Abspaltung der Nucleinbasen aus der Nucleinsäure die Thyminsäure gewonnen hatten,³⁾ fanden sie die gleiche Eigenschaft bei der Thyminsäure wieder. Diese Beobachtungen geben eine Erklärung dafür, dass aus Organextracten, welche Nucleinsäure oder Thyminsäure enthalten, nicht die ganze Menge der Nucleinbasen durch die gebräuchlichen Fällungsmittel zu gewinnen ist.

Diese Thatfachen haben die Veranlassung zu den folgenden Untersuchungen gegeben. Bei den engen chemischen Beziehungen der Purinbasen zu der Harnsäure lag es nahe, das Verhalten der Harnsäure zu der Nucleinsäure und Thyminsäure zu prüfen. Ich habe diese Prüfung auf Veranlassung des Herrn Professor A. Kossel unternommen; dieselbe hat ein ganz besonderes biologisches Interesse, da die Frage nach

1) Vorläufig mitgetheilt in den Sitzungsberichten des Vereins für die Beförderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg. Sitzung vom 6. April 1900.

2) E. du Bois-Reymonds Archiv für Physiologie 1893, S. 164. Anm.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 74.

Lösung gehalten wird, für physiologische und pathologische Erwägungen sehr bedeutungsvoll ist.

Die zunächst angestellten Versuche, welche sich auf die Ausfällung der Harnsäure durch Ammoniumchlorid und durch Silbernitrat bezogen, schienen der Annahme einer Verbindung nicht günstig zu sein. Als Beispiel gebe ich folgenden Versuch:

Eine Lösung von Harnsäure wurde in drei gleiche Theile von je 100 ccm. getheilt. Der erste Theil (a) diente direkt zur Bestimmung des Harnsäuregehalts, der zweite Theil (b) wurde mit 0,5 g Hefenucleinsäure, der dritte Theil (c) mit 0,5 g Thymusnucleinsäure versetzt. In allen drei Portionen wurde eine Harnsäurebestimmung nach Hopkins in folgender Weise ausgeführt:

In 100 ccm. der Flüssigkeit wurden 30 g Salmiak in der Kälte gelöst. Die Anfangs trübe Flüssigkeit klärte sich beim Stehen, während das Ammonurat sich absetzte. Der abfiltrirte und mit gesättigter Salmiaklösung gewaschene Niederschlag wurde mit Wasser erhitzt und mit einigen Cubikcentimetern concentrirter Salzsäure versetzt. Das Volumen der Flüssigkeit betrug 20—30 ccm. Die beim Erkalten ausgeschiedene Harnsäure wurde nach mehrstündigem Stehen auf gewogenem Filter gesammelt und gewogen. Für je 15 ccm. Mutterlauge zählte ich nach Hopkins der gewogenen Harnsäure 1 mg zu.

Die Untersuchung ergab folgende Resultate:

a) Ohne Zusatz:

100 ccm. Flüssigkeit enthielten:

Versuch I	0,3385 g Harnsäure,
„ II	0,3365 g „

b) Zusatz von 0,5 g Hefenucleinsäure:

100 ccm. Flüssigkeit ergaben:

Versuch I	0,3215 g Harnsäure,
„ II	0,3177 g „

c) Zusatz von 0,5 g Nucleinsäure aus Thymus:

100 ccm. Flüssigkeit ergaben:

Versuch I	0,3095 g Harnsäure,
„ II	0,3119 g „

kennbarem, doch immerhin recht geringem Maasse durch die Nucleinsäure und das Nuclein behindert.

In ganz anderer Weise tritt die Einwirkung der Nucleinsäure hervor, wenn man die Fällung der Harnsäure oder des sauren harnsauren Natrons durch Säuren in Betracht zieht. Ich führe zunächst eine Versuchsreihe an, bei welcher die Abscheidung der Harnsäure durch Salzsäure hervorgerufen wurde. Die Versuchsanordnung der ersten Reihe war folgende: je 0,05 g Harnsäure wurde unter Zusatz einer sehr geringen Menge Natronlauge in Wasser gelöst und die Lösung auf 50 ccm. aufgefüllt. Ich bereitete drei solcher Lösungen und fügte zu der ersten Lösung thyminsaures Natron¹⁾ hinzu, welches durch Doppelzersetzung aus 0,5 g thyminsaurem Baryt gewonnen war, zu der zweiten 0,5 g Witte-Pepton, die dritte blieb ohne Zusatz. Sodann wurden alle drei Lösungen mit je einem Cubikcentimeter concentrirter Salzsäure gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag auf gewogenem Filter gesammelt und gewogen. Eine zweite Versuchsreihe stellte ich in gleicher Weise mit 0,2 g Harnsäure an.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Fällung der Harnsäure durch Salzsäure.

50 ccm. Wasser, 1 ccm. concentrirte Salzsäure.

Zusatz	Angewandte Harnsäure- menge	Zeit, bis zur Filtration des Nieder- schlages, Stunden	Aus- geschiedene Harn- säure	In Lösung gebliebene Harnsäure in Procenten der Gesamt- menge
Thyminsaures Natron . .	0,05	24	0,0012	97,6
Witte-Pepton 0,5 g	0,05	24	0,0345	31,0
Ohne Zusatz	0,05	24	0,0380	24,0
Thyminsaures Natron . .	0,2	96	0,0996	50,2
Witte-Pepton	0,2	96	0,1756	12,2
Ohne Zusatz	0,2	96	0,1860	7,0

¹⁾ Vgl. A. Kossel und A. Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, Seite 74.

stzt.

denen des thierischen
 zte ich bei den folgenden
 rn Kohlensäure zur Aus-
 saure Natron löste ich
 mit Salzsäure.
 d aus der folgenden

Kohlensäure.

der Kohlensäure.)

bis Mil- des m- n	Ausge- schiedene Harnsäure in g	In Lösung gebliebene Harnsäure in Procenten der Ge- sammt- harnsäure
	0,009	95,5
	0	100,0
	0,0818	59,1
	1315	67,1
	004	99,9
	68	28,3
	7	47,1
		67,2
		15,6

ganze
 alten.
 äure
 so
 upt

säurelösenden Factor fest, welcher in den Geweben stets zu Gebote steht. Inwiefern dieser Factor bei den complicirten Verhältnissen des Körpers zur Wirkung kommt, das ist eine weitere, bisher nicht gelöste Frage. Vor Allem werden sich weitere Untersuchungen mit der Möglichkeit beschäftigen müssen, ob dieser Factor auch in therapeutischer Hinsicht zu verwerthen ist. Hier würde zunächst nicht die Nucleinsäure in Betracht kommen, sondern die Thyminsäure. Erstere ist eben ein mit den Körpern der Puringruppe bereits beladener Atomcomplex; um diese vielleicht selbst Harnsäure bildenden, also schädlichen, Gruppen zu entfernen, ist es nöthig, sie vorher von den locker gebundenen Basen zu befreien, mit anderen Worten, sie in die Thyminsäure überzuführen. Man würde in der Thyminsäure dem Organismus eine Atomgruppe zuführen, welche nicht nur die Basen der Harnsäuregruppe, sondern auch die Harnsäure selbst bindet und in Lösung hält.

ung der Pentosen.

von

kowski.

—
thologischen Instituts zu Berlin.)

am 1. August 1900.)

Beobachtungen zahlreicher
emer, Tollens und vor
r wohl nicht im Einzelnen
dass von eingegebenen
anscheinlich durch Oxy-
in nicht unerheblicher
eint, ja, dass selbst
te davon im Harn
für den Menschen,
nabe, auch für den
er ist es auffallend,
so grosse Mengen
en, so äusserst
enn diese Er-
erklären mag,
urmkanal aus-
ist, dass die
he etwa im
ls bei Ein-
en Unter-
en Pento-
Mengen
den —,
n zum

könnten und gar nicht zur Resorption gelangen.

Ueber die Gährung der Pentosen ist wenig bekannt. Als feststehend gilt, dass sie der Alkoholgährung durch Hefezellen nicht zugänglich sind, ausserdem liegt meines Wissens nur eine kurze Bemerkung hierüber von Tollens¹⁾ vor. Tollens sagt in einer Anmerkung zu einer Mittheilung von ihm und v. Feilitzen über Gährungsversuche mit Torf: «Neuere von Herrn Schöne im agricultur-chemischen Laboratorium in Göttingen mit Biertrebern und mit Jute angestellte Gährungsversuche haben ebenfalls Zersetzung der sogenannten Pentosane der eben genannten Materialien, und zwar besonders unter Bildung von Säuren gezeigt. Näheres hoffen wir bald mitzutheilen.» Tollens bezieht sich dabei auf eine mir nicht zugängliche Mittheilung von Cross und Bevan, nach welcher die Stoffe der Biertreber, welche beim Destilliren mit Salzsäure Furfurol geben, zum grossen Theil und zuweilen vollständig durch die Gährung mit Hefe zersetzt werden.

Tollens ist, soweit mir bekannt, nicht mehr auf den Gegenstand zurückgekommen und, soviel ich weiss, liegt auch von anderer Seite keine Mittheilung hierüber vor, namentlich nicht über die, mich im Hinblick auf das Verhalten der Pentose im Thierkörper interessirende, Frage, wie sich die Pentosen den Fäulnissbakterien gegenüber verhalten.²⁾ Es fragt sich, ob sie überhaupt zersetzt werden und welche Produkte sie bilden. Bei Anstellung von Versuchen hierüber, welche auch im Hinblick auf die Frage der Möglichkeit der Alkoholbildung aus Pentosen als technisches Problem von Interesse waren, schien es mir, da die Pentosen biologischen Vorgängen gegenüber augenscheinlich resistenter sind, als die Hexosen, nothwendig, die Bedingungen für die Fäulnisszersetzung so günstig wie möglich zu gestalten, d. h. eine Mischung zu wählen, in welcher sich eine erhebliche Quantität eines sehr fäulnissfähigen

1) Ber. der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXX, S. 2577.

2) Bezüglich einer später mir bekannt gewordenen Mittheilung siehe weiter unten.

ser Mischung die Pentose hinzuzusetzen. Durch
Anordnung erschwerte ich mir allerdings, wie
man konnte, meine Aufgabe nach einer Richtung
hinzuweisen selbst liefert bei der Fäulnis so
viele von Säuren, namentlich flüchtigen
wohl noch Aussicht war, durch quantitative
Mittel, ob die Pentosen überhaupt flüchtige
aber nur geringe Aussicht, die Natur
festzustellen. Auch bezüglich der etwa
in Säuren brachte diese Versuchs-
Anordnung. Dennoch habe ich fast alle
Versuchsanordnungen angestellt, weil es
kam, festzustellen, ob die Pentosen
Alkohol liefern, die Feststellung
kam erst in zweiter Linie in Be-

zugung betrifft, so kamen natur-
lich, die l-Arabinose und
aus bestimmten Grunde habe
die Untersuchung herangezogen.
Versuchsanordnungen nach Eingabe
merkliche Anhäufung von
während die Xylose nach
möglich ist, eine Glycogen-
an es als durch die
aus Schülern festgestellt
aus der alkoholischen
flüchtigen zukommt, den
war denkbar, dass
man herausstellen
werden könnte,
welche und den
auf «Pentosen»

sein schwer, einen Gang einzulassen, welcher alle in Betracht kommenden Gesichtspunkte in gleicher Weise berücksichtigte, vollständig ist dieses auch nicht gelungen. Kleine Variationen finden sich ausserdem in den einzelnen Versuchen. Um dem Leser in dieser Beziehung ein Urtheil zu ermöglichen, theile ich die Versuche sämmtlich kurz mit — den ersten etwas ausführlicher — und zwar aus einem bestimmten Grunde in derselben Reihenfolge, in welcher sie angestellt sind.

Versuch I (Arabinose).

Am 8. IX. 1899 wurden in einer Glasstöpselflasche⁻angesetzt: 100 g feingehacktes Fleisch, 1 Liter Leitungswasser, 10 ccm. gesättigte Natriumcarbonatlösung. Die Mischung reagirt nach starkem Umschütteln alkalisch, sie kommt in den Thermostaten bei 40°.

Am 9. IX. werden der stark faulig riechenden Mischung 5 g Arabinose hinzugesetzt, weiter digerirt.

Am 11. IX. noch reichlich Arabinose vorhanden (kleine Proben der Mischung im siedenden Wasserbad erhitzt, das klare Filtrat geprüft).

Am 13. IX. nur noch Spuren von Arabinose vorhanden.

Am 15. IX. derselbe Befund; die Flasche aus dem Thermostaten genommen. Die Mischung reagirt sehr schwach alkalisch.

Der Inhalt der Flasche wird in einen grossen Kolben entleert, derselbe mit Watte gut zugestopft und auf dem Wasserbad erhitzt: das gelöste Eiweiss coagulirt gut aus. Nach dem Erkalten wird filtrirt, nicht nachgewaschen. Das Filtrat wird auf 1100 ccm. aufgefüllt.

1. N-Bestimmung: 20 ccm. erfordern 13,05 $\frac{1}{2}$ % Säure, für die ganze Flüssigkeit ergibt dieses 2,020 g N, etwa 60 g in Lösung gegangenen und zersetztem Fleisch entsprechend.¹⁾

2. Die ganze übrige Flüssigkeit 1060 ccm. in 2 annähernd gleiche Theile getheilt und destillirt. Von jedem Antheil werden ca. 15 ccm. abdestillirt und vereinigt = 30 ccm. Das Destillat ist stark ammoniakalisch und riecht gleichzeitig nach Alkohol, zeigt Neigung, mit bläulicher Flamme zu brennen, gibt mit K_2CrO_4 und SO_4H_2 Grünfärbung, Aldehydgeruch, starke Aldehydreaction: ein mit ammoniakalisch-alkalischer Silberlösung getränkter Papierstreifen schwärzt sich sofort beim Einführen in das betreffende Reagensglas. Der von den Versuchen noch übrige, bei Weitem grösste Theil dieses Destillates wird nach dem Ansäuern mit Oxalsäure destillirt, das sauer reagierende Destillat wird fractionirt, das bis 90° Uebergehende aufgefangen.

¹⁾ Die N-Bestimmung ist selbstverständlich nur approximativ, da Ammoniak verloren gegangen war, sie sollte nur zur Orientirung dienen.

aufgefällt zu 1 Liter) versetzt, 125 ccm. abdestillirt,
 m. Wasser hinzugegeben und wieder 150 ccm. ab-
 en des gesammten Destillats betrug also etwa
 l auf 300 ccm. aufgefüllt, 100 ccm. mit $\frac{1}{4}$ Lauge
 cm. Dieses ergibt für die 30 ccm. $3 \times 16,3$
 e filtrirte Faulflüssigkeit $48,9 \times 11 = 537,9$ ccm.
 end 8,069 g Essigsäure. Selbstverständlich
 dass die flüchtige fette Säure Essigsäure war.
 is = 200 ccm. wurde auf etwa noch darin
 das Destillat gibt Jodoformreaction, mit
 ion; bei nochmaligem Destilliren riechen
 vol. Derselbe ist also unvollständig ab-
 n und ist in dem ersten Versuch absicht-
 alkoholhaltige Flüssigkeit nicht zu sehr

s Haupttheils der Faulflüssigkeit wird
 richtet werden.

(Xylose).

ersten Versuch, ein Gemisch von
 umcarbonatlösung in den Thermo-

k faulig. Es wurde ihr eine
 hinzugesetzt.

am 2. X. sehr schwach, am

ssen Blechflasche destillirt,
 bindung von H_2S mit etwas
 tropfen Schwefelsäure an-
 n dieses neuen Destillates
 ren von Alkohol in den
 nreaction und Aldehyd-
 actionirte Destillation
 ng des Befundes von
 on K_2CrO_4 und SO_4H_2
 bung und Aldehyd-
 itroprussidnatrium,

d in eine Schaaale
 irt.

Säure, für die

wurden 100 ccm. genau so wie im Arabinoseversuch verarbeitet. Das Destillat auf 300 ccm., 100 ccm. erfordern 49,2 ccm. Viertelnormalnatron. Daraus berechnet sich das für die ganze Quantität erforderliche Natron auf 5,90 g entsprechend 8,85 g Essigsäure.

3. Ueber die Verarbeitung des Haupttheils der Flüssigkeit siehe weiter unten.

Versuch III (Kontrollversuch).

Eine ebenso angesetzte Mischung mit Fleisch ohne Pentosezusatz wird ebenso untersucht.

Von der Mischung wurden 100 ccm. aus der Blechflasche abdestillirt, wie im Versuch II verarbeitet; Alkohol daraus nicht isolirbar, aber durch Jodoformbildung und Aldehydbildung mit K_2CrO_4 und SO_4H_2 nachweisbar. Die rückständige Flüssigkeit auf 1100 ccm., filtrirt.

1. N-Bestimmung in 20 ccm., erfordert 12,05 ccm. $\frac{1}{5}$ Säure; die ganze Flüssigkeit enthielt demnach 1,856 g N (immer abgesehen von dem bei der Destillation übergegangenen Ammoniak).

2. 100 ccm. auf flüchtige fette Säure untersucht. Die ganze Flüssigkeit erfordert 3,52 g NaHO = 5,28 g Essigsäure.

3. Ueber die Verarbeitung der Hauptmenge siehe weiter unten.

Versuch IV (Kontrollversuch).

Ist eine genaue Wiederholung von III mit demselben Resultat. Die flüchtigen Säuren erfordern für die ganze Quantität berechnet 3,70 g NaHO = 5,55 g Essigsäure.

Versuch V (Arabinose).

Fäulnissmischung angesetzt am 13. X. Am 14. X. volle Fäulniss, 5 g Arabinose hinzugesetzt. Bereits am folgenden Tage sind nur noch Spuren von Arabinose vorhanden.

Die ganze Mischung wird aus einer grossen Blechflasche destillirt, zwei Antheile zu je 100 ccm. abdestillirt.

1. Die ersten 100 ccm. mit etwas Bleicarbonat geschüttelt, filtrirt, mit SO_4H_2 angesäuert, destillirt, 30 ccm. aufgefangen, diese mit aufgesetztem Linnemannschen Siederohr fractionirt, das bis 90° Uebergehende aufgefangen; das Destillat brennt mit blauer Flamme, gibt starke Jodoform- und Aldehydreaction.

Die zweiten 100 ccm. gaben schwache Jodoform- und Aldehydreaction und wurden nicht weiter verarbeitet.

2. N-Gehalt der ganzen Flüssigkeit — abgesehen von dem in den 200 ccm. Destillat enthaltenen Ammoniak — 1,571 g.

3. Die flüchtigen Säuren der ganzen Flüssigkeitsmenge erfordern 4,71 g NaHO = 7,075 g Essigsäure.

Alkohols wurden die noch vorhandenen Reste — es war bei Weitem die Hauptmenge, da zu den Proben nur wenig verbraucht war — aus Versuch I und V, beide aus Arabinose, vereinigt, geglähtes Kaliumcarbonat hinzugesetzt, welches sich grösstentheils löste. Es bilden sich 2 Schichten, die obere Schicht wird mit dem Scheidetrichter abgetrennt und aus einem ganz kleinen Siedekölbchen mit Linnemann'schem Siederohr destillirt; etwas unter und bei 79° gehen 3,5 ccm. Alkohol über. Zur Bestimmung des specifischen Gewichts wurden 2 ccm. mit einer genauen Messpipette abgemessen und in ein vorher bei 100° getrocknetes und gewogenes Wägegöläschen eintropfen gelassen. Das Gewicht des Alkohols ergab sich zu 1,6184 g. Somit betrug das specifische Gewicht 0,809 g, entsprechend fast 97%igem (Volumprocent) Alkohol. Es sind somit aus 10 g Arabinose, abgesehen von kleinen anderweitig verbrauchten Mengen, 3,5 g fast 97%iger Alkohol erhalten worden.

Es wurde nun zunächst ein weiterer Versuch mit Xylose angestellt, um zu sehen, ob diese in der That im Gegensatz zur Arabinose keinen Alkohol liefert.

Versuch VI (Xylose).

Die Fäulniszmischung angesetzt 1. XI., am 2. XI. volle Fäulniss, 5 g Xylose hinzugesetzt. Schon am 3. XI. Xylosereaction sehr schwach. Am 4. XI. fast Null.

1. Untersuchung auf Alkohol in 2 von der ganzen Mischung abdestillirten Antheilen von 100 ccm. negativ, abgesehen von Spuren, welche sich auch in den Kontrollversuchen fanden.

2. N in der ganzen Flüssigkeit 1,61 g (immer abgesehen von dem zuerst übergegangenen Ammoniak).

3. Die flüchtigen Säuren erfordern 4,811 g Natron, entsprechend 7,216 g Essigsäure.

Der Sicherheit halber wurde noch ein dritter Versuch mit Xylose angestellt.

Versuch VII (Xylose).

Derselbe ist eine genaue Wiederholung von VI, es wurde indessen nur auf Alkohol untersucht — mit negativem Resultat.

Xylose nur flüchtige fette Säuren liefere, die Arabinose ausserdem Alkohol. Der nächste Versuch, welcher etwas anders angeordnet war, zeigte, dass dieses auch bei der Arabinose nicht constant der Fall ist. Das Abweichende in dem Versuch bestand darin, dass eine verdünnte Fäulnismischung angewendet wurde, um die Quantität der vom Eiweiss gelieferten flüchtigen Säure herabzusetzen.

Versuch VIII (Arabinose).

Fäulnismischung angesetzt am 13. XI., am 14. XI. volle Fäulniss. Von der Mischung werden 100 ccm. abgegossen, dazu 900 ccm. Wasser, 5 g Arabinose und 2 ccm. Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt; am 16. XI. Arabinosereaction nur noch spurenweise vorhanden. Reaction der Flüssigkeit stark sauer, sie wird mit Na_2CO_3 schwach alkalisirt.

1. Von der aus einer grossen Blechflasche destillirten Mischung wurden 100 ccm. Destillat aufgefangen. Die Untersuchung dieses Antheils auf Alkohol hat ein ganz negatives Resultat.

2. Die flüchtigen fetten Säuren erfordern im Ganzen 1,458 g NaHO = 2,187 g Essigsäure.

Der Misserfolg bezüglich der Alkoholbildung in diesem Versuch konnte vielleicht davon abhängen, dass die Fäulnismischung nur $\frac{1}{10}$ so concentrirt war, wie bisher, es wurde daher noch ein weiterer Versuch angestellt.

Versuch IX (Arabinose).

Fäulnismischung wie gewöhnlich angesetzt am 7. XI., am 8. XI. volle Fäulniss, 5 g Arabinose hinzugesetzt. Am 9. XI. starke Pentosereaction, am 11. XI. Arabinose verschwunden.

Es wird nur auf Alkohol untersucht, das Resultat war negativ.

Ebenso negativ verlief ein 5. Versuch mit einer grösseren Quantität Arabinose.

Versuch X (Arabinose).

Fäulnismischung angesetzt am 13. XII., am 14. XII. wurden ca. 17 g Arabinose hinzugesetzt. An den folgenden Tagen starke Pentosereaction, am 20. XII. nur noch geringe Pentosereaction, sehr starke saure Reaction; es wird Natriumcarbonatlösung bis zur schwach alkalischen Reaction hinzugesetzt.

21. XII. immer noch etwas Pentosereaction. 23. XII. keine Pentosereaction. Ganz schwach saure Reaction.

Die Untersuchung auf Alkohol hatte ein ganz negatives Resultat.

- Die Kontrollmischungen enthalten, wie es scheint, Spuren von Reactionen der Destillate. Die Spuren mögen im Fleisch Fäulniss aus Kohlehydraten hervorrufen. Diese Frage kann hier auf geringen Spuren ist hier nicht zu sich aus den Pentosen

Die unzweifelhaft Alkohol in der Kontrollmischung war vielleicht in der Kontrollmischung, doch ist

Das Destillat in der Kontrollmischung von Alkohol. Aus dem verschiedentlich Versuch über Entdeckung von Alkohol von der Kontrollmischung nachgetrieben worden. Wenn man die Kontrollmischung veranschlagt, so sind nur 2 Kontrollmischungen negativ? Die Kontrollmischung einer Kontrollmischung, ist, recht, dass der Kontrollmischung Ver- doch zu Erstens, von der Kontrollmischung verwendet, Bildung, rose- und

derselben Weise verarbeitet keinen Alkohol ergeben haben. Es wäre doch in der That ein mehr als sonderbarer Zufall, wenn gerade in den beiden positiv ausgefallenen Versuchen mit Arabinose die Apparate mit Alkohol verunreinigt gewesen sein sollten, worauf ich natürlich sorgfältig geachtet habe, oder sonst Alkohol hineingelangt sein sollte, in den anderen nicht. Ich halte das für ganz ausgeschlossen, vielmehr für vollständig sicher, dass in den 2 Versuchen mit Arabinose Alkohol in beträchtlichen Mengen gebildet ist. Hätte ich mich auf die beiden Versuche beschränkt, so wäre ein Zweifel überhaupt nicht aufgetaucht. Warum ist nun aber nur in 2 Versuchen Alkohol gebildet, in 3 nicht? Dafür kann ich keine andere Erklärung geben, als dass das Gemisch von Fäulnisbakterien trotz aller erstrebten Gleichmässigkeit doch variabel ist, in 2 Fällen alkoholbildende Bakterien vorhanden waren, in den 3 anderen nicht. Leider habe ich, da ich nach den beiden ersten positiv ausgefallenen Versuchen natürlich nicht daran zweifelte, dass jeder weitere Versuch dasselbe geben werde, versäumt, von der Fäulnismischung etwas abzuimpfen.

2. Flüchtige Fettsäuren. — Ein grosser Theil der Arabinose und Xylose geht sicher in fette Säuren über, welche schon Tollens als Produkte der durch Mikroorganismen bewirkten Zersetzung von Pentosen angegeben hat.

Die Kontrollfäulnismischungen enthielten, auf Essigsäure berechnet, im Mittel 5,365 g¹⁾ Essigsäure, die Arabinosemischungen bei Anwendung von 5 g Arabinose im Mittel der beiden Versuche Nr. I und Nr. IV 7,567 g, es würden demnach auf 5 g Arabinose 2,202 g flüchtige fette Säuren, als Essigsäure berechnet, kommen. Die Xylose lieferte aus 5 g im

¹⁾ Diese Zahlen sind selbstverständlich nur approximative, da bei der Destillation behufs Alkoholnachweis natürlich neben Ammoniak auch flüchtige Fettsäuren übergegangen sind. Die flüchtigen Fettsäuren enthalten andererseits etwas Hydrozimmersäure resp. Phenylelessigsäure, jedoch ist diese Beimischung sehr unbedeutend, da ihre Menge an sich schon sehr gegen die Fettsäuren zurückbleibt und dieselben ausserdem zum Theil im Destillationsrückstand bleiben.

käme somit 2,668 g. In Anbetracht des Umstandes, dass die Arabinose erheblich Alkohol geliefert hatte, die Xylose nicht, ist das Plus an flüchtigen Fettsäuren bei der Xylose gegenüber der Arabinose recht unbedeutend.

Wie dem nun auch sein mag, man wird jedenfalls als erwiesen ansehen dürfen, dass sich aus den Pentosen bei der Fäulniszersetzung flüchtige fette Säuren gebildet haben.

Um über die Natur der gebildeten flüchtigen Säuren und die etwaige Bildung nicht flüchtiger Säuren Aufschluss zu erhalten, wurden folgende Versuche angestellt.

1. Die noch vorhandenen Reste der Faulflüssigkeit der beiden Kontrollversuche, zusammen 1700 ccm., wurden vereinigt, mit Na_2CO_3 alkalisirt und auf ca. 250 ccm. eingedampft, dann stark mit Schwefelsäure angesäuert und bis auf einen geringen Rest abdestillirt, das Destillat mit Na_2CO_3 zur Trockne abgedampft und wieder mit SO_4H_2 destillirt; das Destillat enthielt reichlich auf der Oberfläche schwimmende Oeltropfen, keine Ameisensäure. Um die unlösliche, ölförmige Säure möglichst abzutrennen, wurde vorsichtig Aether aufgegossen, ohne umzuschütteln, dann die ätherische und die wässrige Lösung mit dem Scheidetrichter getrennt. Dabei war allerdings eine geringe Durchmischung nicht zu vermeiden. Die ätherische Lösung wurde in eine Schale bei Zimmertemperatur der freiwilligen Verdunstung überlassen, zum Rückstand Alkohol und etwas Phenolphthalein gesetzt, mit Viertelnormallauge titirt. Es wurden gebraucht 16,65 ccm.

Etwa die Hälfte der wässrigen Flüssigkeit wurde mit NH_3 neutralisirt, durch Erhitzen auf dem Wasserbad von Aether befreit, nach völligem Abkühlen und bei möglichst genau neutraler Reaction mit Silbernitrat gefällt, die entstandene dickliche Fällung abgesogen und so lange mit kleinen Portionen Wasser gewaschen, bis das Filtrat eine nur ganz minimale Reaction mit diphenylaminhaltiger Schwefelsäure gab, dann im Vacuumexsiccator bis zur Gewichtconstanz getrocknet.

1. 0,3788 g des Ag-Salzes gaben bei gelindem Glühen 0,2064 g Ag = 54,49%.
2. 0,2364 g Ag-Salz gaben 0,1292 g Ag = 54,70%.

Arabinoseversuche, welche Alkohol ergeben hatten (Nr. I u. IV) vereinigt = 1650 ccm. und ebenso verarbeitet.

Die Quantität der im Wasser unlöslichen Säure war weit geringer. Dieselbe brauchte zur Neutralisirung 4,7 ccm. Viertelnormallauge.

Das Silbersalzgemisch wurde ebenso dargestellt und getrocknet.

1. 0,2578 g Ag-Salz gaben 0,1526 g Ag = 59,19%.

Beim Erhitzen des Ag-Salzes behufs Feststellung des Ag-Gehaltes schien es, dass dasselbe noch Spuren von Nitraten enthielt; die erhaltene Zahl = 59,19% muss dadurch natürlich beeinflusst werden. — Der schon merklich gebräunte Rest des Silbersalzes wurde daher in der Reibschale mit Wasser verrieben, abfiltrirt, gewaschen, bis die Reaction mit diphenylaminhaltiger Schwefelsäure nur andeutungsweise erschien, abgesehen, getrocknet.

2. 0,4084 g gaben 0,248 g Ag = 60,72%.

3. Ebenso wurden die Reste der beiden ersten Xyloseversuche bearbeitet. Es war fast nichts von ölförmiger Säure zu bemerken. Der geringfügige, beim Verdunsten des Aetherauszuges bleibende Rückstand war nach Zusatz von 0,3 ccm. Viertelnormallauge schon übertitrirt, die Quantität der in Wasser unlöslichen Säure war also fast Null.

Die Analyse des Ag-Salzes ergab

1. 0,2945 g gaben 0,1805 g Ag = 61,15%

2. 0,3532 g 0,2174 g Ag = 61,55%.

4. Da die Silberbestimmung in dem Ag-Salz aus den Arabinoseversuchen vielleicht nicht ganz einwandfrei war, wurde noch die Säure aus dem letzten Versuch mit ca. 17 g Arabinose dargestellt. Das Destillat enthielt keine irgend merkliche Quantität von Oeltropfen. Der Silberniederschlag aus etwa der Hälfte des Destillates war sehr reichlich und daher durch einfaches Waschen auf dem Filter nicht salpetersäurefrei zu bekommen, er wurde daher in der Reibschale aufs Neue mit Wasser verrieben, filtrirt, gewaschen, etc.

Quantität Arabinose fast nichts, bei dem Xyloseversuch weniger als 0,3 ccm. Schwerlich ist hierin eine spezifische Wirkung der Pentosen zu sehen, Hexosen werden vermuthlich dieselbe Wirkung haben; es wird sich voraussichtlich um eine weitere, bisher noch nicht bekannte, Bethätigung des Einflusses der Kohlehydrate auf die Fäulniss des Eiweisses handeln, der schon so vielfach, aber noch immer nicht ausreichend, untersucht ist. Diese Nebenwirkung bildet ohne Zweifel eine Erschwerung für die Feststellung der Entstehung der Essigsäure aus der Pentose; sie ist auch wohl die Ursache, dass die Erhöhung des Ag-Gehaltes grösser ist, als sich der Berechnung nach ergibt. Da die flüchtigen Säuren etwa zu $\frac{2}{3}$ aus Eiweiss stammen, zu $\frac{1}{3}$ aus Pentose, so würde der Ag-Gehalt des Silbersalzes, wenn sich die aus der Pentose stammende Essigsäure den flüchtigen Fettsäuren aus dem Eiweiss einfach addirte, nur $\frac{2 \cdot 54,6 + 64,67}{3} = 57,95\%$ betragen, während er thatsächlich weit höher ist. Noch grösser würde natürlich die Differenz zur Berechnung sein, wenn die im Wasser unlöslichen Fettsäuren nicht, so gut es ging, abgeschieden wären.

Trotz dieser Complication kann man, glaube ich, an der Bildung von Essigsäure aus den Pentosen nicht zweifeln.

Dieselben Flüssigkeiten, welche ich zur Untersuchung auf flüchtige Fettsäuren benutzt hatte, dienten, nach dem Abdestilliren dieser, zur Untersuchung auf etwa vorhandene, nicht flüchtige ätherlösliche Säuren. Auch die Rückstände von den behufs quantitativer Bestimmung der flüchtigen Fettsäure vorgenommenen Destillationen wurden noch mit dazu genommen. In dem Bericht über die Resultate kann ich mich sehr kurz fassen. Ausser Spuren von nicht hydroxylirten aromatischen Säuren, von denen etwas natürlich auch in den flüchtigen Fettsäuren enthalten war, und aromatischen Oxyssäuren wurde in allen Mischungen Bernsteinsäure gefunden, aber in sehr verschiedener Menge. Aus den mit Pentose versetzten Mischungen gelang es leicht, durch Ausschütteln mit Aether, Abdestilliren, Aufnehmen in Wasser wässrige Lösungen zu erhalten, welche nach dem

Dieselben erstarrten eingedampft in toto krystallinisch. Die abgepresste und einmal aus Wasser umkrystallisierte Säure erwies sich als Bernsteinsäure. Auch in den Kontrollmischungen fehlte die Bernsteinsäure natürlich nicht vollständig, ihre Menge war jedoch augenscheinlich viel geringer. Zahlen lassen sich schwer angeben. Die rohe Säure aus 10 g Arabinose wog ca. 0,9 g, die aus Xylose 0,7 g.

Zur Bestätigung wurde der nicht zu Reactionen verbrauchte Rest der Bernsteinsäure aus Arabinose durch Fällung der mit Ammoniak genau neutralisirten Lösung mit Silbernitrat in das Ag-Salz übergeführt, welches nach gutem Auswaschen über Schwefelsäure, dann bei 100^o getrocknet und analysirt wurde.

1. 0,2038 g hinterliessen beim Glühen 0,1906 g Ag = 64,5%,
erfordert 65,01%.
2. 0,1803 g mit CuO verbrannt lieferten¹⁾ 0,0972 CO₂ und 0,0194 H₂O.
Hieraus ergibt sich

	berechnet	gefunden
C	14,46	14,70
H	1,20	1,19.

Die aus der Xylose erhaltene Bernsteinsäure ging leider, nachdem die Sublimirbarkeit festgestellt und der Schmelzpunkt (180^o) bestimmt war, durch einen Unfall verloren.

Schliesslich noch 2 Bemerkungen.

1. Ich schliesse aus den Versuchen, dass die Arabinose unter geeigneten Bedingungen, welche noch nicht näher bekannt sind, durch Gährung Aethylalkohol liefern kann; ich schliesse aber nicht, dass dieses Vermögen der Xylose unter allen Umständen abgeht. Da von den 5 Arabinoseversuchen 3 nach dieser Richtung hin negativ verlaufen sind, Versuche mit Xylose aber nur 3 angestellt sind, so können ja die 3 Xyloseversuche nur zufällig ein negatives Resultat gehabt haben.

2. Ich verkenne durchaus nicht, dass die Versuche, über welche im Vorstehenden berichtet worden ist, an vielfachen

¹⁾ Die Analyse ist von dem Assistenten des Laboratoriums, Herrn Dr. C. Neuberg, ausgeführt.

materialien bedingt sind. In der Annahme, dass die Pentose schwer zersetzlich sein würde, habe ich, um möglichst günstige Bedingungen für die Zersetzung herzustellen, in die Mischungen viel Eiweiss hineingebracht. Dadurch ist in die Versuche unnöthiger Weise eine grosse Complication hineingetragen und die Deutung der Ergebnisse erschwert worden. Eine Erklärung für die Wahl dieser Mischungen trotz der wohl zu erwartenden Complicationen liegt ausserdem darin, dass es mir vor Allem um die Beantwortung der Frage zu thun war, ob die Pentosen Alkohol liefern können, hierfür aber die Entstehung von Fettsäuren etc. ziemlich irrelevant war. Nachdem es sich jetzt gezeigt hat, dass die Pentosen durchaus nicht so schwer zersetzt werden, müssen die Versuche unter Verwendung einer sehr geringen Quantität Nährsubstanz für die Bakterien — am besten unter Anwendung verschiedener Reinculturen — wiederholt werden. Es wird dann auch möglich sein, auf die Frage der Bildung von Kohlensäure einzugehen, was die jetzt gewählte Versuchsanordnung nicht gestattete. Die Untersuchung soll unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte fortgesetzt und womöglich die Bedingungen ermittelt werden, unter denen die Pentosen Alkohol liefern.

Erst nach Abschluss meiner Versuche erhielt ich Kenntniss von einer Arbeit von Dr. Ernst Bendix:¹⁾ «Ueber die Gährung schwer vergährbarer Zuckerarten». Verfasser theilt darin u. A., leider in sehr grosser Kürze, mit, dass es ihm gelungen ist, Xylose, Rhamnose und Arabinose durch aus bakterienhaltiger Presshefe oder aus Faeces gezüchtete Bakterien in Gährung zu versetzen, wenn die Mischungen gleichzeitig Pankreaspulver oder Ovariumpulver oder auch Pepton enthielten, und zwar gelang dieses am besten mit Xylose, weniger gut mit Rhamnose, am wenigsten mit Arabinose. Die Versuchsanordnung hat mit der meinigen grosse Aehnlichkeit, ist indessen nicht als gleichbedeutend anzusehen, da 1. Arabinose bei mir ebenso leicht zerfiel wie Xylose, und 2. Rohrzucker bei mir gleichfalls

1) Zeitschr. f. diät. und physik. Therapie, Bd. III, Heft 7, S. A.

festgestellt hatte, während er bei der Ver-
von Bendix unzersetzt blieb.
der Gährungsprodukte äussert sich Bendix

über die Art der Gährung ein vorläufiges
können, untersuchten wir die Produkte der
man fand sich in allen Fällen Alkohol, der
Lieben'schen- und Chromsäurereaction
man fanden sich reichlich flüchtige Fett-
Von den Gasen bestanden etwa zwei
nach Absorption mittelst Kalilauge übrig
nicht brennbar; wahrscheinlich bestand

Aus den Ergebnissen ist der Befund von
• den Alkoholgehalt betrachte ich
• und, da die Lieben'sche Reaction
• ist ganz eindeutig sind, namentlich
• gebildeten Aldehyd nachweist,
• der Bildung kleiner Mengen
• nicht in Abrede stellen will.

Der Lecithingehalt der Milch und seine Abhängigkeit vom relativen Hirngewichte des Säuglings.

Von
Apotheker **Rob. Burow**, stud. med.

(Aus dem Laboratorium des Herrn Prof. G. v. Bunge in Basel.)
(Der Redaction zugegangen am 2. August 1900.)

Nach den bisherigen Analysen¹⁾ ist die Menschenmilch auffallend viel reicher an Lecithin als die Kuhmilch. Diese Thatsache führte meinen Lehrer Herrn Prof. von Bunge auf die Vermuthung, es könnte bei den verschiedenen Säugethieren der Lecithingehalt der Milch sich richten nach dem relativen Hirngewichte des Säuglings.

Ich beschloss daher auf Veranlassung von Professor v. Bunge:

1. Eine genaue Methode der Lecithinbestimmung ausfindig zu machen;
2. den Lecithingehalt des Gehirns zu bestimmen und mit dem der übrigen Gewebe, insbesondere des Muskelgewebes, zu vergleichen;
3. das relative Hirngewicht des Säuglings bei den verschiedenen Species zu bestimmen;
4. den Lecithingehalt der Milch bei verschiedenen Säugethieren zu bestimmen und das Gewichtsverhältniss des Lecithins zu den anderen Milchbestandtheilen festzustellen.

¹⁾ Tolmatscheff, Med. chem. Untersuchungen von Hoppe-Seyler, Heft 2, S. 272, 1867.

Stoklasa, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 341, 1897.

$Mg_2P_2O_7$ wurde das Lecithin berechnet.

Die von mir in den folgenden Versuchen angewandte Kuhmilch wurde in meiner Gegenwart gemolken. Ich machte dieselbe durch Zusatz eines kleinen Krystalles von Kalium bichromicum für längere Zeit haltbar. Die erste Lecithinbestimmung führte ich genau nach der soeben beschriebenen Methode von Stoklasa aus und fand in den vereinigten Aether- und Alkoholextracten $0,0196 Mg_2P_2O_7$; die zweite Bestimmung änderte ich in der Weise ab, dass ich das erhaltene Aether- und Alkoholextract getrennt auf $Mg_2P_2O_7$ weiterverarbeitete. Hierbei zeigte sich nun, dass im Aetherextract keine wägbaren Mengen (Spuren) $Mg_2P_2O_7$ enthalten waren, dagegen im Alkoholextract $0,0194 Mg_2P_2O_7$.

Letzteres merkwürdige Resultat lässt nur zwei Erklärungen zu: entweder das Lecithin wird beim Eindampfen durch sich niederschlagendes Eiweiss (Casein + Albumin) dermassen eingehüllt, dass es sich der späteren Aethereinwirkung vollständig entzieht, oder das Lecithin wird beim Eindampfen zersetzt und die gebildete Glycerinphosphorsäure später vom Alkohol aufgenommen. In der Milch sind aber ausserdem noch anorganische Phosphate enthalten. Ich stellte daher eine Reihe von Versuchen mit löslichen Phosphorsalzen an. Unter Anderem bestimmte ich quantitativ aus 100 ccm. einer 2%igen Lösung von phosphorsaurem Natrium (Na_2HPO_4), genau nach der Methode von Stoklasa behandelt, den Phosphorgehalt. In dem erhaltenen Aetherextract konnte keine Spur von Phosphorsäure nachgewiesen werden, während ich aus dem Alkoholextract $0,057 g Mg_2P_2O_7$ erhielt. Es geht hieraus deutlich hervor, dass die hohen Zahlen, die Stoklasa erhielt, zum grössten Theile von anorganischen Phosphaten herrühren dürften, wobei auch vielleicht Glycerinphosphorsäure nebenbei mit in Lösung gegangen ist. Nach diesen Untersuchungen halte ich die Methode von Stoklasa nicht für einwandfrei, und wenn Hoppe-Seyler in seinem Handbuch für chemische Analyse Seite 405 schreibt: „Der bisher am meisten benutzte Gang der Analyse seröser Flüssigkeiten verlangte Abdampfen

siren des Rückstandes und Extraction desselben, successive mit Aether, Alkohol u. s. w. Obwohl diese Methode einfacher und zweckmässiger erscheinen kann, bietet sie hinsichtlich des Trocknens, Pulverisirens und Extrahirens derartiger sehr compacter Rückstände sehr bedeutende Schwierigkeiten, ausserdem wird dabei das Lecithin grösstentheils zersetzt und unbestimmbar. — so glaube ich den Beweis für die Richtigkeit der auch von Hoppe-Seyler kritisirten Methode der Lecithinbestimmung durch meine Untersuchungen erbracht zu haben.

Zahlreiche weitere Untersuchungen, auf welche hier näher einzugehen zu weit führen würde, ergaben, dass für Lecithinbestimmungen in Substanzen u. s. w., in welchen neben Lecithin noch anorganische Phosphatverbindungen enthalten sind, einzig und allein nur die im Aetherauszuge enthaltene Phosphorsäure als vom Lecithin herrührend anzusehen ist; ferner dass als bestes Lösungsmittel für Lecithin Aetheralkohol zu gleichen Theilen zu verwenden ist und eine Temperatur von bis 50° C. nicht überschritten werden darf.

In allen nun folgenden Lecithinbestimmungen arbeitete ich nach folgendem Gang: Ich stellte mir zunächst eine Mischung her aus 100 ccm. Aether und 100 ccm. Alkohol, welcher Mischung ich noch circa 5 Tropfen einer verdünnten Essigsäure (30%ige CH_3COOH) zusetzte. — Durch den Zusatz der gleichen Menge Aether zum Alkohol wird die Löslichkeit der anorganischen Salze (Phosphate) auf ein Minimum beschränkt, ohne die Löslichkeit des Alkohols auf Lecithin herabzumindern. Der geringe Zusatz der Essigsäure bezweckt die vollständige Ausfällung der gesamten Eiweissstoffe. — In die so hergestellte Mischung trug ich 100 ccm. Milch mittelst Pipette tropfenweise und unter fortwährendem Umschütteln ein. — Tropfenweise und unter Umschütteln deshalb, um eine möglichst feine Gerinnung der Eiweissstoffe herbeizuführen und dadurch ein Mitniederreissen und Umhüllen von Lecithin zu verhindern. — Diese so in einem Erlenmeyer'schen Kolben vorgenommene Mischung liess ich wohl verschlossen unter öfterem Umschütteln 24 Stun-

der Rückstand sorgfältig noch mit Aetheralkohol ausgewaschen und die so erhaltenen Filtrate in einer Porzellanschale bei einer 50° C. nicht übersteigenden Temperatur im Thermostaten (Brutkasten) zum zähen Syrup concentrirt — bis also Aether, Alkohol und das gesammte Wasser verdunstet war, und die zähe Masse nur noch aus Fett, Lecithin und Spuren anorganischer Salze bestand. Den oben erhaltenen Rückstand, der für die weitere Analyse nicht mehr in Betracht kommt, will ich mit I bezeichnen, da ich auf denselben weiter unten noch zu sprechen komme. Die zur Syrupconsistenz eingedampfte Masse laugte ich mit reinem wasserfreien Aether zu wiederholten Malen erschöpfend aus. Den hierbei erhaltenen minimalen, für die weitere Analyse ebenfalls werthlosen Rückstand will ich der späteren Besprechung wegen mit II bezeichnen. Die Aetherauszüge dampfte ich in einer Platinschale zur Trockene. Den Trockenrückstand veraschte ich unter Zugabe von kohlsaurem Natrium u. s. w. lege artis und bestimmte schliesslich die Phosphorsäure durch Fällung mittelst Chlor-magnesiummischung, wie letztere in der Zeitschrift für analytische Chemie von Fresenius, Jahrgang XII, Seite 243, angegeben ist. Eine Fällung durch schwefelsaure Magnesia wurde umgangen, da man durch dieselbe, wie die Erfahrung lehrt, leicht zu hohe Resultate erhält. Aus dem gewonnenen $Mg_2P_2O_7$ berechnete ich das Lecithin durch Multiplication mit dem Factor 7,27.

Rückstand I und desgleichen Rückstand II habe ich bei den verschiedenen Analysen wiederholt noch einer 30stündigen Aetherextraction im Soxhlet'schen Apparate unterworfen, ohne jemals eine Spur Phosphorsäure nachweisen zu können, so dass ich auf das umständliche und zeitraubende Soxhlet'sche Aetherextractionsverfahren vollständig verzichten konnte.

Nachdem ich so die erste mir gestellte Aufgabe gelöst hatte, konnte ich zur Erledigung der zweiten schreiten. Ich bestimmte den Lecithingehalt im Rindermuskel und Hirn.

125 g sorgfältig von Bindegewebe und Fett befreite Muskelbündel wurden in einer Fleischhackmaschine auf das Feinste zerkleinert. Diesem Fleischbrei entnahm ich 100 g und behandelte sie in der vorne von mir eingehend beschriebenen Methode mit Aetheralkohol u. s. w.; nur liess ich letzteren nicht wie bei Flüssigkeiten (Milch), in welchen das Lecithin ja leichter zugänglich ist, nur 24, sondern 3×24 Stunden einwirken.

Die aus den Aetherauszügen erhaltene Phosphorsäure ergab als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ gewogen $0,082 = 0,596$ g Lecithin.

Gehirnsubstanz.

Aus einem 7 Wochen alten frisch geschlachteten Kalbe hatte ich mir im hiesigen Schlachthause das Hirn herauspräparirt. Nachdem ich dasselbe von Blut, Gefässen, Bindegewebe u. s. w. sorgfältig gereinigt hatte, verrieb ich das ganze Hirn in einem Porzellanmörser zu einem feinen Brei. 100 g des letzteren gelangten in der ganz gleichen Weise zu der Lecithinbestimmung.

Die aus den Aetherauszügen erhaltene Phosphorsäure ergab als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ gewogen $0,544 = 3,954$ g Lecithin.

Was nun die Bestimmung des relativen Hirngewichts, mithin die Beantwortung der dritten Frage, anbelangt, so ermittelte ich dasselbe aus dem absoluten Körper- und Hirngewichte der betreffenden Thiere. Dieselben wurden zunächst lebend gewogen. Darauf wurde, nachdem dieselben getödtet, das absolute Hirngewicht ermittelt durch sorgfältiges Herausnehmen und Wägung der Hirnmasse. Aus den erhaltenen Zahlen wurden die relativen Hirngewichte und aus diesen das durchschnittlich relative Hirngewicht berechnet. Für die relative Hirngewichtsbestimmung beim Rindersäugling gelangten 4 Kälber im Alter von 7 und 8 Wochen zur Wägung, welche ich selbst im hiesigen Schlachthause ausführte. Ich erhielt folgende Zahlen:

Kalb.	I.	II.	III.	IV.
Körpergewicht:	110 000	102 000	106 500	95 500 g
Hirngewicht:	300	220	300	280 g

Aus diesen Zahlen ergab sich im Mittel für das relative Hirngewicht rund 1 : 370.

Zur relativen Hirngewichtsbestimmung beim Hundesäugling wurden gleichfalls 4 Thiere und zwar 2 männliche und 2 weibliche verwandt. Die Thiere entstammten einer 2jährigen Hündin mittlerer Grösse (Pinscher), welche am 28. II. d. J. 9 Junge geworfen hatte. Die Thiere gelangten am 2. III. d. J. zur Wägung, waren mithin 5 Tage alt. Resultat:

Hund:	I. ♀	II. ♀	III. ♂	IV. ♂
Körpergewicht:	200	272	280	306
Hirngewicht:	7,4	9,1	8,2	9,6

Aus diesen Zahlen ergab sich im Mittel für das relative Hirngewicht 1 : 30.

Zur Feststellung des relativen Hirngewichtes beim Säugling des Menschen stand mir kein Material zur Verfügung, so dass ich mich hierbei auf die Angaben Anderer verlassen musste. Das relative Hirngewicht des Säuglings des Menschen beträgt nach Vierordt 1 : 7, nach Tiedemann 1 : 6, nach Junker 1 : 8,3. Ich folge den Angaben Vierordt's als den zuverlässigsten, wie sich aus den Untersuchungen Pfister's und Mies¹⁾ ergibt.

Kurzer Ueberblick und Zusammenstellung der Resultate:

Säugling von:	Rind	Hund	Mensch
Relatives Hirngewicht:	1 : 370	1 : 30	1 : 7

1) Pfister, Arch. f. Kinderheilkunde, Bd. 23 S. 164.

les Lecithins in den verschiedenen
ach der oben von mir beschriebenen
urden jedesmal 100 ccm. Milch ver-
bestandtheilen der Milch wurde die
also Casein + Albumin, aus dem
Stickstoff unter Zugrundelegung
Die Fettbestimmung wurde mit
ctionsapparate, der Milchzucker
ung bestimmt.

ch:

art gemolkenen Mischmilch
analysen und 4 Lecithinbe-
alyse II. sowie Lecithin-
ch Kontrollanalysen.

III.	IV.

.054

17

al die
n mit-

Bestandtheile	I.	II.	III.	IV.
Asche	0,56	0,71	0,7	0,68
Summe der Eiweisskörper	3,49	3,55	4,72	3,58
Fett	3,74	3,69	3,9	3,63
Milchzucker	5,14	4,88	4,6	4,59
Lecithin	0,049	0,054	0,058	0,054
(gefunden als $Mg_3P_2O_7$)	0,0068	0,007	0,0074	0,007

Es geht aus diesen Zahlen deutlich hervor, dass das Lecithin zu den Eiweisskörpern in einem gewissen Abhängigkeitsverhältniss steht; denn bei höherem Eiweissgehalt finden wir auch den des Lecithins grösser und umgekehrt fällt der Lecithingehalt bei niederem Eiweissgehalt.

Es berechneten sich aus den gewonnenen Daten als Mittelwerthe für:

die Summe der Eiweisskörper: 3,84

Lecithin: 0,054

Der Lecithingehalt, procentisch auf den Eiweissgehalt der Milch bezogen, betrug 1,40.

Hundemilch:

Eine 2jährige Hündin von mittlerer Grösse (Pinscherrasse) hatte am 28. II. d. J. 9 Junge geworfen. Vier der letzteren waren am 2. III. d. J., wie bereits oben erwähnt, zur relativen Hirngewichtsbestimmung verwendet worden. Die Milch wurde vom 3. III. an gesammelt. Die Hündin stellte der Gewinnung derselben keinen Widerstand entgegen.

(gefunden als $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$)	0,025	0,024
--	-------	-------

Analyse I die Milch vom 22.—24. Mai

100 ccm. Hundemilch enthielten :

(gefunden als $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$)	0,023	0,022
---	-------	-------

hängigkeitsverhältniss des Lecithingehaltes von dem des Eiweisses.

Es berechneten sich aus den gewonnenen Daten als Mittelwerthe für :

die Summe der Eiweisskörper : 8,05

» » » Lecithin : 0,17.

Der Lecithingehalt, procentisch auf den Eiweissgehalt bezogen, betrug 2,11.

Frauenmilch.

Die zu den folgenden Analysen verwandte Frauenmilch bezog ich aus dem hiesigen Frauenspital. Herrn Prof. Dr. Bumm sowie dessen Assistenzärzte Herrn Dr. Wormser spreche ich auch an dieser Stelle noch für die freundliche Ueberlassung meinen besten Dank aus.

Es wurden im Ganzen 9 Analysen ausgeführt. Bei Analyse I und II konnte der geringen Menge wegen nur die Lecithinbestimmung ausgeführt, bei Analyse III und IV ausserdem noch der Eiweissgehalt bestimmt werden. Bei den fünf letzten Analysen konnten sämtliche Bestandtheile der Frauenmilch ermittelt werden, ausserdem waren den vier letzten Proben noch die gewünschten näheren Angaben über Geburt und Entnahme der Milch beigelegt worden.

100 ccm. Frauenmilch enthielten :

Bestandtheile	I	II	III	IV
Summe der Eiweisskörper	—	—	1,82	1,68
Lecithin	0,057	0,058	0,058	0,057
(gefunden als Mg,P,O ₇)	0,0078	0,008	0,008	0,0078

	VI	VII	VIII	IX
re	Geboren am 10. März Milch vom		Geboren am 11. März Milch vom	
	14. u. 15.	15. u. 16.	12. u. 13.	14. u. 15.
	0,19	0,15	0,3	0,28
	1,98	1,97	2,19	1,97
	3	3,8	3,6	3,48
		6,1	4,7	5,25
		0,058	0,060	0,059
		0,008	0,0083	0,0081

unzweideutig aus den er-
sverhältniss des Lecithins

gewonnenen Daten als

er : 1,90

058.

en Eiweissgehalt der

tersuchungen er-
chiedenen Milch-
ezogen mit dem
ings, so finden
1 so höher ist
ecithingehalt

setzung der Milch dem Bedürfniss des Säuglings entsprochen. Wie die Arbeiten in Bunge's Laboratorium¹⁾ ja deutlich bewiesen haben, hängt die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der Milch bei den verschiedenen Thierspecies eng zusammen mit der Wachstumsgeschwindigkeit des betreffenden Säuglings. So dürfte vielleicht auch der verschiedene Lecithingehalt mit der Entwicklung und dem Wachstum des Gehirns in Verbindung stehen.

Ich hoffe später noch Gelegenheit zu finden, den Lecithingehalt der Milch noch bei anderen Säugethieren zu bestimmen und die gesetzmässige Abhängigkeit des Lecithingehaltes der Milch von dem relativen Hirngewichte auf ihre allgemeine Gültigkeit zu prüfen.

1) Siehe die neueste Zusammenstellung dieser Arbeiten bei Bunge. «Die zunehmende Unfähigkeit der Frauen, ihre Kinder zu stillen u. s. w.» München. E. Reinhardt. 1900.

Bemerkungen über das Nucleohiston.

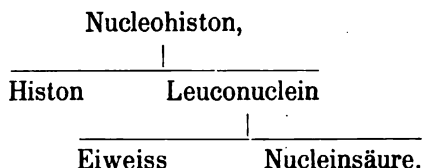
Von

Ivar Bang, Christiania.

(Der Redaction zugegangen am 15. Juli 1900.)

Von allen bis jetzt studirten Nucleoproteiden hat keines ein so allgemeines Interesse erweckt, als das zuerst von Lilienfeld aus Thymus isolirte Nucleoproteid, das Nucleohiston.

Seine chemische Bedeutung verdankt das Nucleohiston seiner Constitution und seinen Spaltungsprodukten. Beim Behandeln mit Salzsäure spaltet sich das Nucleohiston in ein Nuclein, das Leuconuclein, und eine Eiweisssubstanz, das Histon. Das Leuconuclein lässt sich weiter in Eiweiss und Nucleinsäure zerlegen. Nach Lilienfeld's Schema haben wir also:



Diese Auffassung Lilienfeld's über die chemische Zusammensetzung des Nucleohistons ist meines Wissens nie bezweifelt worden. Dieser Körper ist überall als das best-studirte Nucleoproteid angesehen. Viele haben es dargestellt und jetzt kommt es sogar in fabrikmässiger Darstellung von Merck vor. Man hat ja auch seine Jodzahl bestimmt.

Und doch gibt es in der That nach meiner Ansicht kein Nucleohiston!

Als ich zu einem andern Zweck etwas Nucleohiston brauchte, versuchte ich, mir solches nach Lilienfeld's Methode zu verschaffen. Bei der Darstellung dieses Nucleo-

einer genaueren Untersuchung veranlassen. Leider habe ich diese Untersuchung nicht zu Ende führen können, da meine Zeit von anderen Untersuchungen in Anspruch genommen war. Da ich keine Gelegenheit habe, diese Arbeit fortzusetzen, will ich die Resultate, die allerdings etwas lückenhaft sind, jetzt mittheilen.

Zur Reinigung der fein zertheilten Thymusdrüsen versuchte ich dieselben mit 0,9 %iger Kochsalzlösung zu behandeln, ehe ich zu der Extraction mit destillirtem Wasser übergang.

Es zeigte sich auch, dass die Kochsalzlösung viel organische Substanz, wie Blutfarbstoff, Zellendetritus, Fettkörner etc., aufnahm. Die Kochsalzlösung bekam dabei ein milchähnliches Aussehen. Weiter enthielt die Kochsalzlösung Eiweiss. Die Eiweisskörper waren: Albumin (sehr wenig) und Globulin (in nicht unbedeutender Menge). Weiter bekam man mit Essigsäure eine reichliche Fällung. Diese Fällung löste sich leicht in einer Spur von Alkali und konnte wieder auf Neue durch Essigsäure niedergeschlagen werden.

Der Körper enthielt Phosphor und Xanthinbasen, aber keine reducirende Substanz. Bei Digestion mit Pepsinsalzsäure bekam man ein Nuclein. Der Körper war also ein Nucleoproteid. Dieses Nucleoproteid enthielt kein Histon.

Das Nucleoproteid wurde durch Kochsalz, bis zur Sättigung zugesetzt, aus seinen Lösungen vollständig niedergeschlagen. Ebenso verhielt sich Magnesiumsulfat. Halbsättigung mit Ammoniumsulfat schlug es vollständig nieder. Das Nucleoproteid ist nicht weiter untersucht worden.

Durch mehrmaliges Behandeln mit 0,9 %iger Kochsalzlösung konnte man alles oder so gut wie alles Nucleoproteid aus der Thymus extrahiren. Die Lösungen waren auch zuletzt ganz klar und durchsichtig; aller Detritus, Fett u. s. w. waren beseitigt. Zurückblieb dann eine breiige Masse, die, wie die mikroskopische Untersuchung lehrte, aus ganz unveränderten

1) Also ohne vorherige Extraction mit 0,9 % NaCl.

und nach der Kochsalzextraction keinen Unterschied.

Das Nucleoproteid, Albumin, Globulin etc. gehören deswegen wahrscheinlich nicht den Thymuszellen selbst, vielmehr der Inter cellularflüssigkeit an. Diese Inter cellularflüssigkeit enthält kein Nucleohiston.

Nachdem die Thymus mit 0,9%iger Kochsalzlösung erschöpft war, ging man zur Extraction mit destillirtem Wasser über. Nach 24 oder besser 48 Stunden bekam man ein Extract, welches sehr reich an Nucleohiston war. Nun war auch das mikroskopische Bild ganz verändert: Man sieht keine oder jedenfalls wenige unveränderte Zellen, nur kleine Körper, die sich intensiv mit Farben tingiren lassen.

Es fragt sich nun: «Geht auch das Nucleoproteid in die Lösung, wenn man nach Lilienfeld's Methode die Thymussubstanz direkt mit Wasser ohne vorherige Behandlung mit 0,9%iger Kochsalzlösung extrahirt?» Ist nämlich dies der Fall, so kann man annehmen, dass man mit dem Nucleohiston auch das Nucleoproteid niederschlägt, wenn man Essigsäure zur Ausfällung des Nucleohistons der Wasserlösung zusetzt. Um dies zu entscheiden, war es nothwendig, eine Methode zur Trennung des Nucleohistons und des Nucleoproteids ausfindig zu machen. Man konnte zu dem Zwecke auf die Wirkung einiger Salze rekurriren. Lilienfeld hat gefunden, dass das Nucleohiston nicht von $MgSO_4$, bis zur Sättigung zugesetzt, niedergeschlagen wird. Nach seiner Auffassung scheint dasselbe der Fall mit gesättigter Kochsalzlösung zu sein. Da nun aber das Nucleoproteid von diesen Salzen niedergeschlagen wird, könnten vielleicht diese Salze zur Trennung gebraucht werden.

Es lässt sich auch leicht nachweisen, dass die Sättigung des Wasserextractes aus Thymus mit $MgSO_4$ und NaCl einen reichlichen Niederschlag gab.

Wenn man bei Lilienfeld findet, dass eine Lösung von Nucleohiston durch Sättigung mit $MgSO_4$ nicht niedergeschlagen wird, ist dies mir unbegreiflich und steht gänzlich in Widerspruch zu meinen Erfahrungen. Auch kann nicht der Einwand

von Essigsäure niedergeschlagen wird, wenn man beide Körper in der Lösung hat, so dass man durch wiederholte Fällungen und Lösungen eine reine Nucleohistonlösung bekommen kann. Mischen wir nämlich eine Lösung von Nucleoproteid mit einer solchen von Nucleohiston, so bekommen wir mit Essigsäure eine Fällung, welche auch das Nucleoproteid enthält. Diese Fällung wird von Alkali, zu ganz schwach alkalischer Reaction zugesetzt, wieder gelöst und die Lösung enthält auch das Nucleoproteid.

Wenn man eine vom Nucleoproteid freie Nucleohistonlösung darstellen will, ist es deshalb nothwendig, die Thymus erst mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu erschöpfen oder sie auf eine andere Weise vom Nucleoproteid zu befreien.

Nachdem ich diese Thatsache erkannt hatte, ging ich zur Darstellung des reinen Nucleohistons über. Die Thymusdrüsen wurden fein zerschnitten und mit 0,9%iger Kochsalzlösung erschöpft. Darauf erfolgte die Extraction mit destillirtem Wasser. Das Wasserextract wurde dann zum Ueberfluss mit Kochsalz gesättigt und zu meiner Ueberraschung bekam ich eine neue Fällung, die selbstverständlich kein Nucleoproteid enthielt.

War nun das Nucleohiston in diesem neuen Niederschlag zu suchen oder war es in Lösung geblieben?

Der Niederschlag löste sich theilweise in Wasser. Die wässrige Lösung gab mit Essigsäure keine Fällung und enthielt folglich kein Nucleohiston.

Das mit Kochsalz gesättigte Filtrat wurde dialysirt. Nach zwei Tagen war es ziemlich arm an Kochsalz geworden. In dem Schlauche hatte sich eine neue schmierige Fällung gebildet, über dieser war die Lösung ganz klar. Beide wurden auf Nucleohiston untersucht. Die schmierige Fällung löste sich vollständig in Wasser. Diese Lösung verhielt sich ganz eigenthümlich: Setzte ich einige Tropfen gesättigter Kochsalzlösung hinzu, bekam ich einen reichlichen Niederschlag, welcher sich sofort wieder löste, als ich mehr Kochsalz hinzufügte. Auch

nimmt brauchte man Koch-
Niederschlag zu erzeugen,
zuzufügen, um den Nieder-
schlag z. B. Ammoniumsulfat,
Fällung durch 0,6—0,9%
Lösung wurde nun auf
Mineralsäure bekam ich
Fäurereaction gab. Da-
her mit einer Mineral-
säure NH_3 einen Nieder-
schlag Filtrat von dieser
Lösung durch die Ammoniak-
lösung aus kann man mit
geringer Fällung des
Niederschlags enthielt. Da
herfiel, wurde die
Lösung mit Sicherheit

in Lösung über-
Nur ganz win-
nig, 8%iger Salz-
lösung eine Fällung

der Thymus-
drüse gibt und
ein Histon
Vasser, die
zurück steht
s. Dieser
ist That
sächlich Salz-
wie das
Nucleo-

konnte
des

ein unlöslicher Theil zurück, der aber leider sich gar nicht wie ein Leuconuclein verhielt. Zweitens war es auch ganz unbegreiflich, wie wenig Histon man im Salzsäureextract bekam. Mehrere Drüsen waren in Arbeit genommen und doch bekam ich nur eine höchst unbedeutende Menge Histon. Das kochsalzgesättigte Filtrat enthielt also kein Histon. Der im Wasser lösliche Theil des Niederschlages (= Niederschlag des Wasserextractes durch Kochsalzsättigung) enthielt keine durch Essigsäure (und Mineralsäure) fällbare Substanz, also kein Nucleohiston. Nur eine Möglichkeit war da: Das Histon kommt in wässriger Lösung des Niederschlages vor, aber nicht als Nucleohiston. Um dies zu untersuchen, setzte ich zu einer Probe dieser Lösung einige Tropfen Ammoniak und ein Niederschlag kam zugleich zum Vorschein. Zusatz von Alkali bewirkte ebenfalls eine richtige Fällung. Die Fällung löste sich in einer Spur von Salzsäure und fiel bei Neutralisation der Lösung nicht aus.

Nun ist der basische Eiweisskörper Histon in Wasser unlöslich. Es ist folglich nothwendig, dass die eine oder die andere Substanz das Histon hier in wässriger Lösung erhält. Die wässrige Lösung reagirt neutral. Es ist deswegen überschüssige Säure hier nicht vorhanden. Da aber die Alkalien das Histon hier ausfällen, ist es wahrscheinlich, dass das Histon hier in salztartiger Verbindung vorkommt. Um dies zu untersuchen, wurde das Histon durch Alkohol und Aether aus der Wasserlösung niedergeschlagen, der Niederschlag wieder in Wasser gelöst und aufs Neue mit Alkoholäther niedergeschlagen. Nach dreimaliger Fällung wurde das Histon mit Alkali eingeäschert, der Rückstand mit Wasser ausgezogen und mit AgNO_3 versetzt. Man bekam einen Niederschlag von Chlorsilber. Es ist deshalb ziemlich wahrscheinlich, dass das Histon als salzsaure Verbindung vorhanden ist.

Damit ist nicht bewiesen, dass das Histon grösstentheils als salzsaure Verbindung in der Thymus existirt, obwohl dies nicht unwahrscheinlich ist. Das Histon ist bei unserem Verfahren nirgends mit Salzsäure in Berührung gekommen. Die

salzes in Wasser entsteht, dürfte wohl ohne Bedeutung sein. Auch habe ich bei einigen Versuchen die Sättigung mit Kochsalz so rasch wie möglich vollendet und den Niederschlag gleich filtrirt, ohne irgend einen Unterschied bemerken zu können.

Dagegen ist es nicht unmöglich, dass das Histon überhaupt nicht als salzsaure Verbindung vorkommt. Das Chlor kann möglicher Weise nur eine Verunreinigung sein, die trotz der Reinigung verbleibt. Das Histon kommt dann vielleicht mit Eiweisssubstanzen verbunden vor, obwohl die Verbindung des Histons mit den gewöhnlichen Eiweisskörpern in Wasser unlöslich ist. Nachdem das Histon aus der wässerigen Lösung mit Alkali niedergeschlagen ist, bekommt man auch in dem Filtrate eine deutliche Biuretreaction, obwohl das Histon quantitativ ausgefällt wird. Die Alkaloidreagentien geben auch im Filtrate eine Fällung.

Es ist deshalb nicht mit Sicherheit bewiesen, dass das Histon als salzsaure Verbindung hier vorkommt, vielmehr ist eine geringe Möglichkeit vorhanden, dass es als eine Eiweissverbindung existirt.

Wir haben auch nicht mit Sicherheit bewiesen, dass der Körper, den wir mit dem Namen «Histon» bezeichnet haben, in der That das Thymushiston ist. Zwar ist die Ammoniakreaction positiv ausgefallen, es stehen jedoch mehrere Histonreactionen aus. Nun war aber die Kochprobe positiv. Beim Kochen der Lösung bekam man eine Fällung, wenn Kochsalz dabei war, keine Fällung aber in kochsalzfreier oder kochsalzärmer Lösung. Die Alkaloidreagentien schlugen den Körper bei neutraler Reaction nieder. Die Lösung gab mit einer Eiweisslösung oder Albumosenlösung einen Niederschlag, der sich wie die Eiweiss-Histonfällung verhielt. Somit waren die meisten Histonreactionen positiv ausgefallen. Der einzige Unterschied war die Salpetersäurereaction. Hier bekam man zwar eine Fällung, diese Fällung war aber beim Erhitzen nur unvollständig löslich. (Eine Salzsäurebehandlung machte keinen Unterschied.) Was dieser Unterschied bedeutet, kann ich nicht

nach dem Histon gesucht habe, kann dieser Unterschied wohl nur wenig bedeuten. Zuletzt wurde auch das gereinigte Histon analysirt. Das Resultat mehrerer Stickstoffanalysen, die alle gut übereinstimmen, war ein N-Werth von 18,05%, welcher Werth ganz gut mit dem Stickstoffwerth, den ich für das Thymushiston gefunden habe, nämlich 18,38%, übereinstimmt. Da dies der Fall ist, kann man kaum daran zweifeln, dass hier ein Histon vorliegt, welches in allen wesentlichen Punkten mit dem Thymushiston übereinstimmt.

Wir haben also gefunden, dass man durch Sättigung des Wasserextractes aus Thymusdrüsen mit Kochsalz einen Körper, welcher sich wie Histon verhält, niederschlagen kann. Wir haben auch gefunden, dass das Nucleohiston in der Thymus überhaupt nicht vorkommt. Es fragt sich nun, warum kann man mit Essigsäure eine solche Fällung bekommen, die als eine chemische Verbindung des Histons mit einem anderen Körper imponiren kann.

Ehe wir zur Beantwortung dieser Frage übergehen, möchte ich zunächst einige Untersuchungen besprechen. Wenn man nach dem Erschöpfen der Thymusdrüse mit 0,9%iger Kochsalzlösung die Thymusdrüse mit Wasser extrahirt, bekommt man eine Lösung, die man direkt durch 0,9%ige Kochsalzlösung fractioniren kann. Man bekommt durch Zusatz von Kochsalz bis 0,9% einen Niederschlag und eine Lösung. Den Niederschlag kann man im Wasser lösen und durch wiederholte Lösungen und Fällungen mit 0,9% Kochsalz weiter reinigen. Es lässt sich leicht zeigen, dass diese Lösung nur Spuren vom Histon enthält. Die Lösung dagegen enthält das Histon, welches man durch Sättigung mit Kochsalz isoliren kann.

Wenn man also den Niederschlag durch 0,9% Kochsalz gelöst hat, bekommt man durch Sättigung mit Kochsalz eine Fällung, die uns nicht weiter interessirt, und ein wasserklares Filtrat. Dieses Filtrat gibt mit Alkohol einen weissen Niederschlag, der sich im Wasser löst und aufs Neue mit Alkohol niedergeschlagen werden kann. Nach wiederholten Reinigungen bekommt man einen Körper, der keine Biuretreaction gibt.

mit Essigsäure, eine Fällung. Die Substanz enthält Xanthinbasen und viel Phosphor. Die Tollen's'sche Pentosereaction ist positiv. Dagegen bekommt man nach dem Kochen mit einer Mineralsäure keine Reduction. Einige quantitative Phosphorbestimmungen gaben leider kein so gut übereinstimmendes Resultat, dass ich hier veröffentlichen will. Jedenfalls enthält der Körper über 8% P. Man kann deshalb nicht daran zweifeln, dass hier eine Nucleinsäure vorliegt. Wenn man dem beistimmen will, ist also bewiesen, dass die Thymus, oder correcter ausgedrückt, das Wasserextract der Thymus freie Nucleinsäure enthält oder jedenfalls, dass die Nucleinsäure in so loser Verbindung vorkommt, dass ein Zusatz von Alkohol die freie Säure ausfällen kann. Wird das alkoholische Filtrat stark concentrirt, kann man daraus einen Körper isoliren, welcher eine Biuretreaction gibt, nicht aber von Salpetersäure niedergeschlagen wird. Die Alkaloidreagentien geben einen Niederschlag. Der Körper ist nicht das Parahiston. Die Nucleinsäure selbst gibt mit 0,9%iger Kochsalzlösung keinen Niederschlag, wenn man sie nach der Alkoholbehandlung in Wasser löst. Dies spricht entschieden dafür, dass sie nicht als freie Nucleinsäure im Wasserextract vorkommt, da man sie hier mit 0,9%iger Kochsalzlösung niederschlagen kann. Weitere Untersuchungen sind hier erforderlich.

Obwohl die Nucleinsäure selbst nicht von Essigsäure niedergeschlagen wird, bekommt man doch in einer Lösung, welche die Nucleinsäure und Eiweiss enthält, mit Essigsäure einen reichlichen Niederschlag. Ebenso verhält sich die Nucleinsäure und das Histon. In einer Lösung, die Nucleinsäure und Histon enthält, bekommt man durch Essigsäure einen Niederschlag, welcher sowohl das Histon, als die Nucleinsäure enthält. Wird ein solcher Niederschlag mit 0,8%iger Salzsäure behandelt, geht das Histon in die Lösung, nicht aber die Nucleinsäure. Nun können wir auch begreifen, was die Essigsäurefällung des Wasserextractes aus Thymus, die man Nucleohiston nennt, bedeutet. Das Wasserextract enthält nach unseren Untersuchungen Histon, Nucleinsäure und Nucleo-

wenig interessieren. Setzt man Essigsäure hinzu, bekommt man einen Niederschlag, der aus dem Nucleoproteid und Histon-Nucleinsäure besteht. Dies ist das «Nucleohiston». Wird nun das «Nucleohiston» mit 0,8%iger Salzsäure extrahiert, geht das Histon in die Lösung, und das «Leuconuclein», d. h. das Nucleoproteid + Nucleinsäure bleibt zurück.

Nun steht es aber fest, dass man im Wasserextract aus Thymus das Histon durch die Ammoniakreaction nicht erkennen kann. Man hat ja auch dies als einen Beweis dafür angesehen, dass kein freies Histon hier vorkommt. Ich habe in einer früheren Arbeit bewiesen, dass der Ammoniakreaction keine besondere Bedeutung als Histonreaction zukommt. Dass der negative Ausfall der Ammoniakreaction hier keine Bedeutung hat, ist auch leicht zu demonstrieren. Zuerst will ich daran erinnern, dass das Histon mit Eiweiss vermischt, nicht durch Ammoniak niedergeschlagen wird; ich kann jetzt hinzufügen: auch das Histon wird nicht von NH_3 niedergeschlagen, wenn die Nucleinsäure dabei ist. Wenn nun das Wasserextract aus Thymus sowohl Histon, als Eiweiss und Nucleinsäure enthält, kann das Histon nicht durch Ammoniak niedergeschlagen werden.

Weiter habe ich gefunden, dass das Histon mit einer Eiweisslösung einen Niederschlag gibt. Es ist deshalb schwer verständlich, dass man hier sowohl Histon als genuinen Eiweisskörper in der Lösung hat. Nun habe ich diesmal auch gefunden, dass das Histon nicht diese Eiweisskörper niederschlägt, wenn die Lösung auch die Nucleinsäure enthält. Hierdurch ist auch dieser Widerspruch beseitigt.

Durch diese nur vorläufigen Untersuchungen glaube ich festgestellt zu haben, was wir unter dem Nucleohiston zu verstehen haben, jedoch dies nur in den Hauptzügen. Sicher spielen auch mehrere andere nicht oder wenig studirte Substanzen, die hier vorkommen, eine untergeordnete, aber nicht zu übersehende Rolle. Meine Bemerkungen geben nur eine Orientirung über die Frage. Der Weg, den man hier gehen soll, ist aber, glaube ich, gezeigt.

auf Thymus stelle ich die Thatfachen in folgender Tabelle zusammen.

Thymussubstanz mit 0,9%iger Kochsalzlösung extrahirt.

a) Lösung enthält: Albumin, Globulin, Nucleoproteid.		a) Unlöslicher Theil mit destillirtem Wasser extrahirt.	
b) Lösung mit 0,9%iger Kochsalzlösung versetzt.		b) Unlöslicher Theil nicht genauer untersucht, enthält wahrscheinlich ein Nucleoproteid.	
c) Niederschlag in Wasser gelöst, mit Kochsalz gesättigt.		c) Lösung mit Kochsalz gesättigt.	
d) Niederschlag Eiwisskörper, vielleicht histonartig.	d) Filtrat mit Alkohol versetzt.	d ₂) Niederschlag besteht aus Histon und wahrscheinlich geringen Mengen anderer Substanzen.	d ₃) Filtrat enthält Nucleinsäure, wahrscheinlich dieselbe wie Fraction e.
e) Niederschlag besteht aus Nucleinsäure.		e) Filtrat histon- oder protaminähnlicher Körper.	

Anhang.

In den verschiedenen Fractionen habe ich auch nach dem Parahiston, einem von Fleroff gefundenen Körper, gesucht, habe aber keinen guten Erfolg gehabt. Dass indessen ein solcher Körper in der That in der Thymus vorkommt, ist unbestritten. Ich selber habe das Parahiston nach Fleroff's Vorschrift gefunden und ein wenig untersucht. Meine Untersuchungen, die Fleroff's Beobachtungen vervollständigen, sollen hier in aller Kürze erwähnt werden.

Das Parahiston hat wie die Histone und Protamine einen deutlich adstringirenden Geschmack. Die Biuretreaction und Millon'sche Reaction waren positiv. Beim Kochen mit Salpetersäure bleibt die Lösung farblos, schlägt aber nach dem Zusatz von Ammoniak ins Gelbe über. Eine Parahistonlösung gibt mit Ammoniak keinen Niederschlag, gleichgültig, ob Ammoniaksalze dabei sind oder nicht. Ebenso verhält sich verdünnte Natronlauge. Dagegen gibt 30%ige Natronlauge eine Fällung von Parahiston, anscheinend mit unveränderten Eigenschaften.

Die Salpetersäureprobe und Kochprobe sind negativ. Die Alkaloidreagentien schlagen das Parahiston nieder. Das Para-

schlag, nicht aber mit einer Lösung von Ovalbumin oder Witte'schem Pepton. Der Niederschlag des Parahistons mit Serumeiweiss löst sich in 10%iger Kochsalzlösung. Ebenso verhält sich der Niederschlag von Eiweiss und Histon.

Von den Neutralsalzen gibt gesättigte Ammoniumsulfatlösung eine Fällung, nicht aber gesättigte Kochsalzlösung, auch nicht durch Sättigung der Parahistonlösung mit Kochsalz. Durch Ammoniumsulfat habe ich schon vor Fleroff das Parahiston isolirt, aber nicht genau untersucht.



Bemerkungen zu der vorhergehenden Abhandlung des Herrn Ivar Bang.

Von

A. Kossel.

Lilienfeld¹⁾ hat aus dem Wasserextract der Thymusdrüse und der isolirten Lymphzelle durch Fällung mit Essigsäure einen Niederschlag erhalten, den er Nucleohiston nennt. Derselbe lässt sich in organische Bestandtheile saurer und basischer Natur zerlegen und es ist selbstverständlich, dass die sauren und basischen Affinitäten dieser Stoffe in dem Niederschlag sich gegenseitig absättigen müssen, dass also das Nucleohiston als eine salzartige Verbindung aufzufassen ist. Es ist überdies von Lilienfeld durch Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Phosphor-Bestimmungen festgestellt worden, dass das Nucleohiston eine constante, durch Umfällung nicht zu ändernde Zusammensetzung besitzt.²⁾

Eine von der Existenz des Nucleohistons völlig unabhängige Frage ist die, ob dieser Stoff in der Zelle präformirt ist. Man wird geneigt sein, diese Frage zu bejahen, da man annehmen darf, dass die sauren und die basischen Affinitäten der Componenten des Nucleohistons sich auch im lebenden Protoplasma geltend machen; aber eine klare, festbegründete Einsicht in die chemischen Beziehungen, welche zwischen sauren und basischen Bestandtheilen des Zelleibes obwalten, ist durch die Untersuchung der im Zellextract gefundenen Bestandtheile überhaupt nicht zu erbringen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 478.

²⁾ l. c. S. 480.

Bang in der vorhergehenden Abhandlung kommt, lässt sich nur daraus erklären, dass Herr Bang die eben definirte Fragestellung nicht klar erfasst hat. Herr Bang vermengt offenbar die Frage nach der Existenz des Nucleohistons mit der Frage nach dem präformirten Vorkommen in der Zelle. Herr Bang behauptet nach seinem Verfahren die Bestandtheile des Nucleohiston gesondert aus dem Thymusgewebe dargestellt zu haben. Will Herr Bang hieraus in allem Ernst den Schluss ziehen, dass diese Bestandtheile, die zum Theil saure, zum Theil basische Eigenschaften besitzen, sich unter anderen Verhältnissen z. B. bei dem Lilienfeld'schen Verfahren, nicht zu einem salzartigen Körper, dem «Nucleohiston» vereinigen können? Oder will Herr Bang nur behaupten, dass das Nucleohiston nicht in der Zelle präformirt ist? Im ersteren Falle muss Herr Bang auch die Existenz des Kochsalzes leugnen, da man die Bestandtheile desselben gesondert darstellen kann, im letzteren Falle ist die der Bang'schen Abhandlung vorangestellte, gesperrt gedruckte These «Es gibt kein Nucleohiston», sinnlos. Die Lilienfeld'schen Arbeiten werden dann durch die Erörterungen des Herrn Bang gar nicht berührt.

Offenbar glaubt Herr Bang durch seine Untersuchungen den Nachweis geliefert zu haben, dass die Componenten des Nucleohistons, nämlich Nucleinsäure, Nuclein und Histon in der Zelle nicht mit einander vereinigt sind, da sie bei Behandlung des Thymusgewebes mit Kochsalzlösung, Wasser und Alkohol gesondert erhalten werden. Dieser Beweisführung liegt die unrichtige Voraussetzung zu Grunde, dass das Kochsalz gegenüber den in der Zelle wirksamen chemischen Affinitäten ein indifferentes Agens sei. Wer die schnelle Zerstörung nucleinreicher Gebilde, z. B. gewisser Spermaköpfe, durch Kochsalzlösung gesehen hat, wird die chemische Wirkung des Kochsalzes auf die salzartigen Verbindungen der Nucleinstoffe für eine sehr intensive halten. Dasselbe folgt übrigens auch aus den Angaben des Herrn Bang selbst — soweit sich aus den wenig eingehenden Untersuchungen desselben überhaupt ein Schluss ziehen lässt. Man muss nämlich aus dem Versuch des Herrn

bindung der Nucleinsäure durch concentrirte Kochsalzlösung zerlegt wird. Die Frage nach der Präexistenz des Nucleohistons in der Zelle ist also nach den Untersuchungen des Herrn Bang ebenso dunkel, wie sie vorher war.

Eine genauere Beurtheilung der Versuche des Herrn Bang wird dadurch unmöglich gemacht, dass die Angaben des Herrn Bang über die in den einzelnen Fractionen erhaltenen Körper ganz unvollständige sind.

Herr Bang verschweigt, dass bereits Herr Lilienfeld durch Extraction der Thymusdrüse mit Kochsalzlösung ein Nucleoproteid dargestellt und analysirt hat.¹⁾ Es entspricht nicht dem Gebrauch bei wissenschaftlichen Discussionen, dass der Leser durch Verschweigung dieser Thatsache in dem Glauben gelassen wird, Herr Lilienfeld habe diesen Körper übersehen, sei dadurch zu unrichtigen Vorstellungen gekommen und es sei erst Herrn Bang vorbehalten geblieben, durch die Auffindung dieses Nucleoproteids die Sachlage zu klären.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 475.

Zur Frage nach dem Chemismus der vitalen Harnstoffbildung.

I. Einleitung.

Von

Wl. Gulewitsch.

(Der Redaction zugegangen am 4. August 1900.)

Die schon seit langer Zeit existirende Theorie, welche die Harnstoffbildung im Thierorganismus mit der Thätigkeit von Oxydationsprocessen in einen Causalzusammenhang stellt, hat ihre Bedeutung bis jetzt bewahrt, wenn auch nicht in ihrem ganzen Umfange. Während man früher die Harnstoffbildung im Thierorganismus als Process einer rein oxydativen Spaltung von Eiweisskörpern betrachtete und sogar zur Meinung von der Präexistenz des Harnstoffrestes im Eiweiss geneigt war, theilen die neueren Theorien, z. B. Schmiedeberg's¹⁾ Anhydridtheorie, auch den anderen Processen, ausser den oxydativen, eine Mitwirkung bei der vitalen Harnstoffbildung zu. Desgleichen erklärt z. B. die von Schultzen und Nencki²⁾ vorgeschlagene Carbaminsäuretheorie in ihrer neueren von Drechsel³⁾ und Nencki⁴⁾ gegebenen Gestalt die Bildung des Harnstoffs im lebendigen Organismus durch die sich abwechselnd abspielenden Oxydations- und Reductionsprocesse.

Die Bedeutung der Oxydationsreactionen für die vitale

1) Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 8, S. 1.

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 2, S. 566.

3) Beiträge zur Physiologie, C. Ludwig zu seinem 70. Geburtstage gewidmet. Leipzig 1886. S. 1.

4) M. Hahn, O. Massen, M. Nencki und J. Pawlow. Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 32, S. 206.

aus noch dadurch beschränkt, dass die meisten von diesen Theorien den Satz zulassen müssen, dass als unmittelbares Material für die Harnstoffbildung auch diejenigen Substanzen dienen können, deren Vorkommen im Organismus nicht unbedingt in einen Zusammenhang mit der oxydativen Spaltung von Eiweisskörpern zu bringen ist. So soll sich z. B. nach Schmiedeberg's Theorie der Harnstoff im Organismus aus Kohlensäure und Ammoniak bilden, wobei das Ammoniak sowohl ein Oxydationsprodukt der stickstoffhaltigen Bestandtheile des Organismus sein, wie auch zum Organismus von aussen her gelangen oder sich bei der hydrolytischen Zerspaltung der Eiweissstoffe der Nahrung durch die Verdauung resp. bei der Hydrolyse der stickstoffhaltigen Bestandtheile des Organismus selbst bilden kann.

Mit dieser Begrenzung aber, welche als unentbehrliches Postulat der neueren Vorstellungen von der vitalen Harnstoffbildung folgt, wird die Hauptmenge des sich im Organismus bildenden Harnstoffs auch zur Zeit (und zwar mit Recht) als Produkt der Einwirkung von oxydativen Processen des Organismus betrachtet. Gerade kürzlich sind noch zwei Beweise für die oxydative Bildung des Harnstoffs im Organismus erbracht worden. Der eine ist die Entdeckung von Oxydasen, durch deren Vermittelung man die Phänomene der vitalen Oxydation zu erklären versucht. Der andere Beweis ist die von Hofmeister¹⁾ gefundene Bildung von Harnstoff bei der künstlichen Oxydation von Eialbumin und Leim. Bekanntlich war A. Béchamp der Erste, welcher den Harnstoff durch künstliche Oxydation von Eiweiss bekommen haben wollte, doch erwies sich später diese Behauptung von A. Béchamp als eine irrthümliche und vor den Hofmeister'schen Untersuchungen konnte der Harnstoff durch die Oxydation von Eiweissstoffen trotz der zahlreichen Arbeiten in dieser Richtung nicht erhalten werden. Die negativen Resultate früherer Untersuchungen dürfen keineswegs gegen die oxydative Bildung von

1) Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 37, S. 435.

seine chemische Thätigkeit sicher andere Mittel benutzt als diejenigen, die dem Chemiker in seinem Laboratorium zur Verfügung stehen. Obgleich die Bildung des Harnstoffs in Hofmeister's Versuchen unter Bedingungen erzielt wurde, die von denjenigen jedenfalls verschieden waren, welche im lebenden Organismus Statt haben, füllen diese interessanten Untersuchungen die Lücke auf willkommene Weise aus, die bis jetzt in der Lehre von der oxydativen Bildung des Harnstoffs aus stickstoffhaltigen Bestandtheilen des Organismus vorhanden war.

Wenn wir für die Erklärung der vitalen Bildung des Harnstoffs ausser den rein oxydativen Processen noch die Harnstoffsynthese durch die Einwirkung von Anhydrirungsprocessen und Processen der abwechselnden Oxydation und Reduction anerkennen werden, sind dadurch alle Wege noch nicht aufgezählt, die zur Bildung des Harnstoffs im Organismus führen; es bleibt unter Anderem noch eine Gruppe von Reactionen, die den Harnstoff im Organismus erzeugen können — namentlich die der Reactionen von hydrolytischer Spaltung der stickstoffhaltigen Bestandtheile des Organismus.

Schon seit langer Zeit sind einige Substanzen im Organismus bekannt, z. B. Kreatin, Kreatinin, Oxalursäure u. A., aus denen der Harnstoff durch hydrolytische Spaltung sehr leicht erhalten wird, und unwillkürlich ergibt sich die Vermuthung, dass auch im Organismus ein Theil des Harnstoffs durch die Hydrolyse dieser Verbindungen entsteht. In neuerer Zeit fand Drechsel,¹⁾ dass das sogenannte Lysatin, welches er bei der hydrolytischen Spaltung der Eiweissstoffe entdeckt hat, beim Kochen mit Barytwasser Harnstoff liefert; aus dieser That- sache zog Drechsel die Folgerung, dass der Harnstoff sich im Organismus auch durch die hydrolytischen Processe bilden kann. Die Bedeutung dieser Angabe von Drechsel wurde noch dadurch bekräftigt, dass eine Reihe von höchst interessanten und wichtigen, in dieser Zeitschrift veröffentlichten

1) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 23, S. 3096.

E. Schulze⁴⁾ gezeigt hat, dass alle Eiweissstoffe, der hydrolytischen Spaltung durch siedende Mineralsäuren unterworfen, Arginin meistens in einer beträchtlichen Menge liefern; das Arginin aber, wie E. Schulze und Likiernik⁵⁾ gefunden haben, sich beim Kochen mit Barytwasser unter Bildung von Harnstoff zersetzt.

Drechsel (a. a. O.) glaubte sogar, die Menge des Harnstoffs, die sich im Organismus durch die hydrolytische Spaltung der Eiweissstoffe bilden kann, durch Rechnung feststellen zu können. Indem Drechsel die von Schützenberger⁶⁾ bei der Barytspaltung des Eiweisses bestimmte Menge Kohlensäure als Äquivalent für das zuerst abgespaltene Lysatin und den daraus hervorgehenden Harnstoff betrachtete, meinte er, dass durch die vitale Hydrolyse der Eiweissstoffe eine Menge Harnstoff entsteht, die 10% der gesamten sich im Organismus bildenden Quantität Harnstoff beträgt. Aber die Gültigkeit einer solchen Berechnung kann aus verschiedenen Gründen bezweifelt werden. Erstens ist es nicht bekannt, ob nicht die Kohlensäuremenge, auf die Drechsel seine Annahme basirte, in einem anderen Spaltungsprodukte der Eiweissstoffe als dem Lysatin oder, wollen wir jetzt lieber sagen, dem Arginin ihre Quelle hatte. Zweitens kann man aus Eiweissstoffen eine grössere Menge Arginin bekommen, als nach der von Schützenberger gefundenen Quantität Kohlensäure vorauszusetzen wäre. So beträgt z. B. nach Hausmann's⁷⁾ Bestimmungen der Stickstoff, der bei der Spaltung des Eiweisses durch Mineralsäuren in die durch die Phosphor-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 186; Bd. XXI, S. 155.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 176; Bd. XXV, S. 551. Vgl. auch: A. Kossel und F. Kutscher, Sitzungsber. d. Ges. zur Beförd. d. ges. Naturw. zu Marburg, Sitzung vom 6. April 1900.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 195, 551; Bd. XXVI, S. 110.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276.

5) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 24, S. 2701.

6) Ann. de chim. et de phys. [5], vol. 16, p. 289; Bull. de la soc. chim. de Paris, vol. 23, p. 161.

7) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 143.

23,51%, für das Serumglobulin 24,95%, für das Globin 29,37%, für den Leim 35,83% der gesammten Stickstoffmenge, und Arginin macht bekanntlich die Hauptmasse von drei bei der Eiweisshydrolyse zu erhaltenden Hexonbasen: Arginin, Histidin und Lysin. Andererseits aber darf man nicht behaupten, dass die ganze Menge Arginin, die aus dem Eiweiss durch die künstliche Spaltung entsteht, sich auch im Organismus daraus bildet; die Processe der vitalen Eiweisszerlegung, sogar die der hydrolytischen, müssen, sowohl qualitativ, wie auch quantitativ, von den Processen der künstlichen Hydrolyse zweifellos verschieden sein. Ausserdem ist es denkbar, dass die durch Kochen der Eiweissstoffe mit Säuren veranlasste Bildung von Arginin unter Atomverschiebung statthat, welche von der sich bei der vitalen Eiweisspaltung abspielenden bedeutend verschieden sein kann. Wenn solche Atomverschiebung schon bei einfacher Spaltung von einfachen Verbindungen, wie z. B. bei der Alkoholgährung der Glucose, beobachtet wird, so ist sie noch leichter möglich bei der hydrolytischen Spaltung von so complicirt zusammengesetzten Körpern, wie es die Eiweissstoffe sind.

Wenn aber die Harnstoffmenge, welche sich im Organismus durch die Hydrolyse der stickstoffhaltigen Bestandtheile bildet, sich zur Zeit auch nicht annähernd ausrechnen lässt, soll jedenfalls die Drechsel'sche Vorstellung über die Möglichkeit dieser Bildungsweise des Harnstoffs als ganz richtig anerkannt werden. Die Produkte der künstlichen hydrolytischen und der vitalen Eiweisspaltung sind einander so ähnlich, dass die Vermuthung ganz gerechtfertigt ist, dass bei der im Organismus statthabenden Eiweisszerlegung eine gewisse Menge Arginin entsteht, welches durch Hydrolyse theilweise in Harnstoff übergeht, der Harnstoffbildung beim Kochen des Arginins mit Barytwasser entsprechend. Es gibt bis jetzt keine experimentellen Beweise dafür, dass ein Theil des Harnstoffs sich im Organismus in der That auf diese Weise bildet, und der Drechsel'schen Ansicht wurde bis jetzt wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

aus Eiweissstoffen durch die Vermittelung von Arginin betrifft, so ist es kaum zu bezweifeln, dass das Arginin im Thierorganismus durch die hydrolytische und nicht durch die oxydative Eiweisspaltung entstehen muss. Darauf weist die Bildung von bedeutenden Argininmengen bei der künstlichen Zersetzung der Eiweissstoffe durch siedende Mineralsäuren bei Gegenwart von reducirenden Mitteln (Zink oder Zinnchlorür) hin. Einige Zweifel könnten hier durch die Untersuchung von Bernert¹⁾ entstehen; der Verfasser hat nämlich bei der Oxydation des Eiweisses mit übermangansaurem Kali unter den Reaktionsprodukten Substanzen gefunden, die nach ihren Eigenschaften eine Aehnlichkeit mit den Hexonbasen, unter Anderen auch mit Arginin, zeigten. Aber wie es aus der Beschreibung des Untersuchungsganges ersichtlich ist, darf man wohl annehmen, dass die von Bernert erhaltenen Hexonbasen ein Hydratations- und kein Oxydationsprodukt waren. Die Möglichkeit der Hydratation bei den Bernert'schen Versuchen wurde durch zwei Bedingungen gegeben: erstens durch die langdauernde, bei Zimmertemperatur stattfindende Einwirkung der bei der Reduction des übermangansauren Kalis gebildeten Kalilauge; dass Albumosen, Peptone und Basen bei seinen Versuchen auf diese Weise gebildet werden konnten, betont der Verfasser selbst.²⁾ Zweitens konnte die Hydratation bei den Bernert'schen Versuchen dadurch verursacht werden, dass der Verfasser die Hexonbasen aus der Lösung isolirte, die Albumosen und Peptone enthielt und die vorher eine längere Zeit mit Schwefelsäure bis zur vollständigen Austreibung der flüchtigen Säuren gekocht wurde; es liegt auf der Hand, dass die Hexonbasen bei diesen Bedingungen unvermeidlich als Spaltungsprodukte von Albumosen und Peptonen durch die Einwirkung der siedenden Säure entstehen mussten.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 272.

2) L. c., S. 293. Die Untersuchungen von Fr. N. Schulz (diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 102) zeigen, wie stark durch Oxydationsprocesses die Fähigkeit des Eiweisses erhöht wird, sogar durch schwach wirkende Agentien hydratirt zu werden.

Ueberganges von Arginin in Harnstoff im Organismus dürften folgende Prozesse mitherangezogen werden: durch die Hydrolyse zerfällt das Arginin unter Bildung von Ornithin und Guanidin. Das Guanidin geht ebenfalls hydrolytisch in den Harnstoff über; da der im Arginin sich befindende Guanidinrest bei der künstlichen Hydrolyse leicht in den Harnstoff übergeführt wird, ist die Vermuthung ganz consequent, dass dieselbe Reaction auch im Organismus vor sich gehen kann. Das Ornithin ist eine Diaminosäure. Für die Monoamino-säuren ist durch die Untersuchungen von Schultzen und Nencki,¹⁾ Salkowski²⁾ und v. Knieriem³⁾ die Möglichkeit des Ueberganges im Organismus in Harnstoff bewiesen. Wenn das Ornithin sich den Monoamino-säuren analog im Organismus ebenfalls in Harnstoff verwandelt, kann es als eine „ δ -Diaminovaleariansäure keinen Harnstoff durch die einfache Hydratation liefern; sein Uebergang in den Harnstoff, wie auch der der Monoamino-säuren, muss durch mehr complicirte chemische Prozesse zu Stande kommen.

Man darf weiterhin wohl annehmen, dass mit der Abspaltung des Arginins aus dem Eiweiss und mit dem Uebergang des Arginins in Harnstoff die Bethheiligung der Hydratationsreactionen an dem Processe der vitalen Harnstoffbildung nicht erschöpft ist. Es ist noch denkbar, dass nicht nur das Arginin im Organismus durch die Eiweisshydrolyse entsteht, sondern auch der Process der vitalen Eiweiss-spaltung überhaupt durch die gleichzeitige Einwirkung von Oxydations- und Hydratationsreactionen bewirkt wird. Die Wichtigkeit der Hydratationsprocesse in der chemischen Thätigkeit des Organismus ist offenbar; es ist hinreichend, auf die peptische und tryptische Verdauung, auf die Umwandlung von Polysacchariden in Di- und Monosaccharide, auf die Fetzerspaltung durch die Einwirkung von Steapsin und lipolytischem Ferment des Blutes

1) Zeitschr. f. Biol., Bd. 8, S. 124.

2) Diese Zeitschr., Bd. IV, S. 100.

3) Zeitschr. f. Biol., Bd. 10, S. 279.

umsatzes können die Hydratationsprocesse nicht bedeutungslos sein. Die Möglichkeit der hydrolytischen Eiweisssspaltung im Organismus wird schon durch die Identität von mehreren als Eiweisszerspaltungsprodukte zu betrachtenden Bestandtheilen desselben¹⁾ mit den Produkten der künstlichen hydrolytischen Eiweisszerlegung angedeutet. Dass die Spaltungsprocesse der complicirten Bestandtheile des Organismus sogar bei Abwesenheit der Oxydationsprocesse statthaben können, zeigen die bekannten Versuche von L. Hermann²⁾ und Bunge,³⁾ die beobachtet haben, dass die überlebenden Muskeln und die Darmparasiten auch in einem sauerstofffreien Raume energische Bewegungen ausführen und Kohlensäure abgeben können; es muss somit bei diesen Versuchen die nicht oxydative Spaltung der complicirten Bestandtheile die in diesen enthaltene potentielle Energie in die kinetische Form übergeführt haben. Desto leichter können die hydrolytischen Spaltungsprocesse bei der gleichzeitigen Oxydation im Organismus verlaufen.

Zur Zeit lässt sich die Frage noch nicht beantworten, in welchem quantitativen und zeitlichen Verhältniss die hydrolytische und die oxydative Eiweisssspaltung im Organismus zu einander stehen. Am wahrscheinlichsten dürfte vielleicht die Vermuthung sein, welche die Erscheinungen der vitalen Eiweisszerlegung mit denen der successiven Spaltung und Oxydation der Eiweissstoffe bei der Verbrennung in Parallele stellt: möglicher Weise wird die vitale Eiweisssspaltung mit den hydrolytischen Processen begonnen, und die mehr oder weniger complicirten Produkte dieser hydrolytischen Zerlegung werden dann oxydirt. Bei dieser Vermuthung könnten die Processe der hydrolytischen Eiweisssspaltung das Material für diejenige Form der Harnstoffbildung liefern, welche z. B. an den von aussen in den Organismus eingeführten Produkten der hydrolytischen Eiweisszersetzung (den Aminosäuren) nachzuweisen ist.

1) Harnstoff, Glycocoll, Amidovaleriansäure, Leucin, Tyrosin, Cystin, Ammoniak.

2) Untersuchungen über den Stoffwechsel der Menschen. Berlin. 1867. S. 62 und 67.

3) Diese Zeitschr., Bd. VIII, S. 48.

stoff im Organismus aus Eiweissstoffen durch die Vermittelung von Arginin kann man schon jetzt experimentell näher treten. Zu dem Zwecke sind zuerst zwei Untersuchungsreihen auszuführen. Man muss erstens entscheiden, ob das vorgebildete Arginin als ein normaler Bestandtheil des Thierorganismus vorkommt (in den Pflanzen wurde das Arginin bekanntlich von E. Schulze und Steiger¹⁾ schon vor langer Zeit aufgefunden); zweitens ist es nothwendig, Versuche über den vermuthlichen Uebergang von Arginin in den Harnstoff im Organismus auszuführen.

Die Untersuchungen fehlen bis jetzt in beiden Richtungen, aber einige Betrachtungen lassen schon zur Zeit das Vorkommen des Arginins als eines Bestandtheiles des Organismus erwarten. So kann z. B. das Arginin in den Organismus mit der pflanzlichen Nahrung eingeführt werden. Wie Kutscher²⁾ gezeigt hat, entsteht das Arginin bei der künstlichen tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe; zwar dauerte die Digestion von Eiweiss mit der verdauenden Flüssigkeit in den Kutscher'schen Versuchen 12 resp. 40 Tage, doch dürfte man erwarten, dass eine obgleich geringe Argininmenge sich auch unter den im Darmkanal vorhandenen Bedingungen bilden kann. Auch die Erkenntniss, dass die den Vögeln gegebene Benzoesäure und Toluol von ihnen als Ornithursäure, d. h. Dibenzoylornithin, ausgeschieden werden,³⁾ führt nothwendig zu der Vorstellung, dass wenigstens bei den Vögeln bei der Zerspaltung des Eiweisses das Ornithin im Organismus erscheint, und es ist wohl möglich, dass im Organismus nicht nur das Ornithin, sondern auch das Guanidinderivat desselben, d. h. das Arginin, vorkommt.

Von den oben zusammengestellten Erwägungen ausgehend, wollte ich die Vermuthung von der Möglichkeit der vitalen Harnstoffbildung bei der hydrolytischen Eiweiss-spaltung durch die Vermittelung des Arginins experimentell prüfen. In

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 43.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 195; Bd. XXVI, S. 110.

³⁾ M. Jaffé, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 10, S. 1925; Bd. 11, S. 406. H. Meyer, *ibid.*, Bd. 10, S. 1930.

schaftlich eine Reihe von Untersuchungen begonnen. In der folgenden Abhandlung werden die Resultate mitgetheilt, welche bei der Untersuchung über das Vorkommen von Arginin in der Milz erhalten wurden.

Zum Schluss möchte ich darauf hinweisen, dass man wohl nicht annehmen kann, die gesammte täglich producirte Harnstoffmenge entstehe auf einem und demselben Wege. Der Harnstoff soll in allen Geweben und Organen des Organismus, vor Allem aber in der Leber, gebildet werden. Bei der bedeutenden Differenzirung der chemischen Function von verschiedenen Theilen des Organismus ist die Annahme unentbehrlich, dass auch der Chemismus der Zerspaltung von Bestandtheilen desselben und somit der Chemismus der Harnstoffbildung in verschiedenen Geweben und Organen ein verschiedener ist. Man muss sich deshalb an die Vorstellung gewöhnen, dass man bei der Betrachtung des Chemismus der vitalen Harnstoffbildung keine Theorie ausschliesslich vertreten darf, dass vielmehr mehrere von den zur Zeit bekannten Theorien und Hypothesen über die vitale Harnstoffbildung das Recht der gleichzeitigen Existenz haben. Ich halte es für wahrscheinlich, um nicht zu sagen für gewiss, dass die Processe der Harnstoffbildung in verschiedenen Organen qualitativ und quantitativ verschieden sind, dass ein Theil des Harnstoffs im Organismus z. B. durch die Eiweisshydrolyse entsteht, ein anderer Theil aus den einfachsten Produkten der Eiweisspaltung durch die Anhydrirung (der Schmiedeberg'schen Theorie entsprechend) aufgebaut wird, dass sich bei der Bildung des dritten Theils des Harnstoffs die Oxydationsprocesse betheiligen (z. B. nach der Hofmeister'schen Theorie), und gleichzeitig mit denselben auch die Reductionsprocesse statthaben können (wie es Drechsel und Nencki annehmen), dass endlich ein Theil des Harnstoffs nach Hoppe-Seyler's Annahme aus der Cyansäure gebildet werden kann u. s. w.; muss doch die allgemeine Mannigfaltigkeit der chemischen Processe des Thierorganismus auch die der Harnstoffbildung miteinschliessen.

Akulowka, den 27. Juli 1900.

Zur Frage nach dem Chemismus der vitalen Harnstoffbildung.

II. Ueber das Vorkommen von Arginin in der Milz.

Von

Wl. Gulewitsch und A. Jochelsohn.

(Der Redaction zugegangen am 4. August 1900.)

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der Universität Charkow.)

Wie aus den theoretischen Betrachtungen folgt, welche von einem von uns (G.) in der vorigen Abhandlung¹⁾ zusammengefasst worden sind, liegt die Vermuthung nahe, dass ein Theil des sich aus dem Organismus ausscheidenden Harnstoffs durch die hydrolytische Spaltung der Eiweissstoffe desselben entsteht. Zur experimentellen Bekräftigung dieser Vermuthung war es von Interesse, wie es auch a. a. O. erwähnt wurde, das Arginin als einen normalen Bestandtheil des Thierorganismus aufzufinden. Von diesen Erwägungen ausgehend, haben wir eine chemische Untersuchung der Ochsenmilz auf das Vorkommen von Arginin in derselben unternommen und sollen die Resultate dieser Arbeit weiter unten mitgetheilt werden. Als Object für die erste Untersuchung, die zur Entscheidung der Frage nach dem Vorkommen von Arginin im Thierorganismus beitragen sollte, haben wir die Milz gewählt, da sich in der Milz die Processe der Spaltung von complicirten Bestandtheilen energisch vollziehen und mehrere Produkte des regressiven Eiweissumsatzes sich darin anhäufen. Ausserdem wird das Milzvenenblut mittelst des Systems der Pfortader direkt der Leber zugeführt, welche das Hauptlaboratorium des Organismus für die Harnstoffbildung ist.

1) Diese Zeitschr., Bd. XXIX, S. 523.

eben getödteten Ochsen entnommen. Die Milzen wurden abpräparirt und mit Hülfe einer Fleischhackmaschine zerkleinert. Der erhaltene Brei wurde mit seinem gleichen Gewichte Wasser, dem 1^o/₁₀ Thymol zugesetzt war, 18 Stunden lang in der Kälte digerirt; die Mischung durch Gaze colirt und der Brei mit Hülfe einer Presse stark abgepresst, was eine nicht ganz leichte Operation darstellte. Der Rückstand wurde mit 3 Liter Wasser und 3 g Thymol nochmals digerirt. Die vereinigten braunrothen Extracte wurden durch ganz kurzes Kochen unter vorsichtigem Zusatz von verdünnter Essigsäure coagulirt, der Niederschlag von Eiweissstoffen abgesaugt und das Filtrat im Vacuum eingedampft, um die Möglichkeit einer hydrolytischen Spaltung der in der Lösung gebliebenen eiweissartigen Körper durch langdauerndes Kochen zu vermeiden.

Die restirenden 1600 ccm. Flüssigkeit, die eine schwach saure Reaction hatten, wurden mit 10^o/₁₀₀iger Silbernitratlösung ausgefällt, der Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat nach dem Kossel'schen Verfahren¹⁾ mit Silbernitratlösung und gepulvertem Barythydrat versetzt. Der Niederschlag (A) wurde abgesaugt und ausgewaschen. Das Filtrat davon, vom Silber durch Schwefelwasserstoff befreit, wurde durch Schwefelsäure neutralisirt, der Niederschlag von schwefelsaurem Baryt abfiltrirt und aus dem stark eingedampften Filtrate salpetersaurer Baryt und Tyrosin möglichst auskrystallisirt. Dann wurde der übrig gebliebene Baryt durch Schwefelsäure vollständig entfernt und die filtrirte Flüssigkeit durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag (B) wurde abgesaugt und ausgewaschen.

Die Untersuchung von A.

Der feuchte, durch Silbernitrat in der alkalischen Flüssigkeit erzeugte Niederschlag wurde in einer möglichst geringen Menge von etwa 15^o/₁₀₀iger Salpetersäure unter Zerreiben im Mörser gelöst, die geringe Menge von reducirtem Silber abfiltrirt und das Filtrat nach dem Verfahren von Hedin²⁾

1) Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 179.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 191.

nitrat und Ammoniak genau ausgefällt. Der geringe Niederschlag wurde noch feucht mit Ammoniak behandelt, der ungelöste Theil abfiltrirt und die Lösung, die eventuell das Histidin enthalten konnte, mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es resultirte eine colloidale Ausscheidung von Schwefelsilber und die Lösung konnte weder durch die Behandlung mit Thierkohle, noch durch Verdampfen zum Trocknen klar erhalten werden. Da dieselbe dazu eine saure Reaction hatte und somit eine Säure enthalten sollte, deren Silbersalz in einer barythaltigen Flüssigkeit unlöslich, in Ammoniak dagegen löslich ist, so wurde die Lösung durch Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Schwefelsäure gefällt. Der geringe Niederschlag wurde durch Zerreiben mit Barythydrat in der Kälte zersetzt, die filtrirte Lösung durch Kohlensäure von Baryt befreit und das neue Filtrat bis auf wenige Tropfen eingedampft, mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit Silbernitrat versetzt. Der geringe Niederschlag wurde abfiltrirt und zum Filtrate verdünntes Ammoniak sehr vorsichtig zugesetzt. Es resultirte nur ein ganz geringer Niederschlag, fast nur eine Trübung, die sich im überschüssigen Ammoniak klar löste.

Somit kann in der Ochsenmilz nur eine verschwindend kleine Menge Histidin enthalten sein, wenn es darin überhaupt vorhanden ist.

Jetzt wollen wir zur Untersuchung des Filtrates übergehen, welches bei der versuchten Trennung von Histidin und Arginin nach dem Hedin'schen Verfahren resultirte (S. 534) und welches somit das Arginin enthalten konnte. Die Flüssigkeit wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit und eingedampft, der Baryt durch Schwefelsäure entfernt und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde ausgewaschen und in der üblichen Weise mit Barythydrat zersetzt. Die Flüssigkeit wurde zu dickem Syrup eingedampft, um das Ammoniak zu entfernen, der Rückstand in Wasser gelöst und die stark alkalisch reagirende Lösung mit Salpetersäure neutralisirt, mit Thierkohle behandelt und mit Silbernitrat versetzt. Die stark eingedampfte Flüssigkeit, welche

feinige Drusen aus, die beim Berühren leicht in sehr dünne, nadelförmige Krystalle auseinanderfielen, wie es bei den Krystalldrusen von saurem Argininsilbernitrat beobachtet wird. Die Krystalle wurden abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen. Das Salz wog 1,1 g. Beim Umkrystallisiren desselben tritt wiederum eine starke Schwärzung ein. Es wurde versucht, die Substanz durch Auflösen in möglichst wenig Wasser und Fällen mit Alkohol-Aether unter Beseitigung des in einer geringen Menge ausgeschiedenen harzartigen Niederschlags zu reinigen; doch blieb auch jetzt die Schwärzung beim Auflösen der Substanz in heissem Wasser nicht aus. Die nochmals mit Alkohol-Aether gefällte Verbindung zeigte einen um etwa 2% geringeren Silbergehalt, als es für das saure Argininsilbernitrat berechnet ist, und einen um etwa 15° niedrigeren Schmelzpunkt.¹⁾ Da bei der geringen Menge der Substanz und bei ihrer leichten Löslichkeit in Wasser nicht zu erwarten war, dass die reducirende Beimischung beseitigt werden konnte, so wurde das Silbersalz in die Kupferverbindung übergeführt.

Zu dem Zwecke wurde das Silber aus der Lösung der Substanz durch Salzsäure entfernt, die filtrirte Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der ausgewaschene Niederschlag aus kochendem Wasser umkrystallisirt; die etwas eingedampfte Mutterlauge gab einen geringen Niederschlag. Die beiden Niederschläge wurden in der üblichen Weise durch Barythydrat zersetzt, wobei eine stark alkalisch reagirende Lösung erhalten wurde. Die eingedampfte Flüssigkeit brauste beim Neutralisiren mit Salpetersäure auf und enthielt somit eine aus der Luft Kohlensäure anziehende Base. Die neutralisirte und weiter concentrirte Lösung krystallisirte nach dem Erkalten bis zum letzten Tropfen, indem sie die für neutrales Argininnitrat charakteristischen kreideartigen Körner ausschied. Das Salz war, ebenfalls dem Argininnitrat ähnlich, in heissem 96%igen Alkohol sehr schwer löslich.

Das Nitrat wurde dann in wässriger Lösung mit Kupfer-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 200.

Carbonat gekocht. Die stark eingedampfte Lösung krystallisirte in Kugeln, die aus dünnen zugespitzten Prismen von ganz demselben Aussehen und demselben Schmelzpunkt wie das Argininkupfernitrat bestanden. Das Salz wurde noch durch das Auflösen in wenig Wasser und durch das Fällen mit einem Ueberschuss von absolutem Alkohol gereinigt, bei 120° getrocknet und analysirt:

0,1866 g Substanz lieferten beim Verbrennen im Schiffchen 0,1872 g CO₂ und 0,0911 g H₂O.¹⁾

Gefunden:

C 27,36%²⁾

H 5,47%

Berechnet für:

(C₆H₁₄N₄O₈)₂ + Cu(NO₃)₂

26,85%

5,27%.

Diese Analyse, wie auch die Eigenschaften des salpetersauren Salzes und der Kupfernitratverbindung zeigen somit, dass die aus der Milz isolirte Substanz mit dem Arginin identisch ist.

Die Untersuchung von B (S. 534).

Der im Filtrate von der Argininsilberfällung durch Phosphorwolframsäure erzeugte Niederschlag wurde in der üblichen Weise durch Barythydrat zersetzt, die dabei erhaltene Flüssigkeit stark eingedampft und mit einer gesättigten alkoholischen Pikrinsäurelösung,³⁾ solange noch ein Niederschlag entstand, versetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit der gesättigten alkoholischen Pikrinsäurelösung ausgewaschen und in Wasser

1) Die Kupferbestimmung missglückte leider, da in Folge des starken Aufblähens der Substanz ein Theil derselben aus dem Schiffchen austrat. Die im Schiffchen übrig gebliebene Kupferoxydmenge entsprach dem Gehalte von 10,93% Cu, während für das Argininkupfernitrat 11,86% berechnet sind.

2) Der gefundene Mehrgehalt von 1/8% C wurde erstens dadurch verursacht, dass die analysirte Substanz ein Nitrat war, und zweitens dadurch, dass dieselbe sich beim Verbrennen im Schiffchen in dem Augenblicke des Schmelzens plötzlich, obgleich theilweise zersetzte und einige Zehntel Gasbläschen in einem raschen Strome durch den Kalipparat entweichen liess. Das Wasser im Chlorcalciumrohr zeigte nach dem Verbrennen eine saure Reaction.

3) A. Kossel, Diese Zeitschr., Bd. XXVI, S. 586.

Aether mit Hülfe eines Extractionsapparates und unter Zusatz von einer genügenden Menge Salzsäure entfernt. Die saure Flüssigkeit enthielt vorwiegend Kaliumchlorid, dem nur eine geringe Menge einer organischen Substanz beigemischt war. Der Versuch, diese Substanz von dem Kalisalz durch wiederholtes Extrahiren mit kaltem 80%igen Alkohol des Rückstandes der zum Trocknen verdampften Lösung zu trennen, gab keine guten Resultate. Der Rückstand des letzten alkoholischen Auszuges wurde in Wasser gelöst und mit der Phosphorwolframsäure gefällt; der Niederschlag wurde abgesaugt, ausgewaschen und mit Wasser ausgekocht, worin nur ein Theil aufgelöst wurde. Die Lösung sammt dem bei dem Erkalten entstandenen Niederschlage wurde durch Barythydrat zersetzt, wobei nur etwa 0,02 g einer organischen, alkalisch reagirenden Substanz erhalten wurde, die beim Verbrennen fast keine Asche lieferte, einen Spermageruch hatte und mit Phosphorsäure einen mikrokrySTALLINISCHEN Niederschlag gab.

Ob hier Lysin resp. Spermin vorlag, konnte wegen des Mangels an der Substanz nicht entschieden werden.

Aus unserer Untersuchung können wir somit die Folgerung ziehen, dass die Ochsenmilz das Arginin enthält, welches hier zum ersten Mal als ein Bestandtheil des Thierorganismus aufgefunden wurde.

Akulowka, den 29. Juli 1900.

Ueber die Constitution des Thymins.

Von

H. Stendel.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 6. August 1900.)

Frühere Versuche, die von A. Kossel¹⁾ und mir angestellt waren, um die Constitution des Thymins klarzulegen, hatten gezeigt, dass das Thymin sich in ähnlicher Weise wie das Methyluracil Behrend's chloriren lässt; die weitere Verarbeitung des Chlorsubstitutionsproduktes musste jedoch bis zur Gewinnung grösserer Mengen desselben verschoben werden. Inzwischen versuchte ich, auf einem andern Wege zu einem abschliessenden Resultat zu kommen, indem ich Methylgruppen in das Thymin einführte, in der Hoffnung, auf diese Weise zu dem Trimethyluracil Behrend's²⁾ zu gelangen, das als Trimethyldioxyypyrimidin aufgefasst werden muss. Es traten nun allerdings ebenfalls zwei Methylgruppen in das Thymin ein, aber das erhaltene «Dimethylthymin» erwies sich nicht mit dem Trimethyluracil von Behrend identisch, sondern war ein Isomeres davon.

Die Methylierung des Thymins nahm ich in ähnlicher Weise vor wie Hoffmann³⁾ diejenige des Methyluracils. Zunächst stellte ich mir durch Eintragen von Thymin in heisse, concentrirte Kalilauge, worin es leicht löslich ist, und Einengen auf ein kleines Volumen das «Thyminkalium» dar, das nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus Wasser in Form kleiner prismatischer Nadeln erhalten wurde. Bei 120° getrocknet, verlor die Substanz langsam 1 Molekül Wasser.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 303.

2) Liebig's Annalen, Bd. 229, S. 23.

3) Liebig's Annalen, Bd. 253, S. 73.

0,5528 g verloren bei 120° 0,0522 g.
Berechnet für $C_5H_5N_4O_3K + H_2O$: 9,9%.
Gef.: 10,2%.

0,2942 g der bei 120° getrockneten Substanz gaben 0,1564 g K_2SO_4 .

Ber. für $C_5H_5N_4O_3K$: 23,82% K.

Gef.: 23,87% K.

5 g Thyminkalium wurden mit 18,5 g Jodmethyl (etwa 1 : 3 Moleküle) 6 Stunden lang auf 150° im zugeschmolzenen Rohr erhitzt; das Reactionsprodukt, das durch ausgeschiedenes Jod braun gefärbt war, wurde mit Chloroform extrahirt, im Chloroformauszug das Jod durch Schütteln mit wenig Na_2CO_3 gebunden, dann das Wasser durch Chlorcalcium entfernt. Nach dem Abdestilliren des Chloroforms wurde die zurückbleibende weisse Salzmasse mit reichlich Aether durchgeschüttelt. Nach dem Filtriren und Verdunsten des Aethers hinterblieb ein in langen Nadelchen krystallisirender Körper, der nach öfterem Umkrystallisiren analysenrein gewonnen wurde. Die Löslichkeitsverhältnisse stimmten vollkommen mit dem Trimethyluracil überein, ebenso ergab die Elementaranalyse Zahlen, die auf die Formel $C_5H_4(CH_3)_3N_4O_3$ stimmten:

0,1628 g gaben 0,3244 CO_2 und 0,0976 H_2O .

0,1386 g gaben 22 ccm. N bei $t = 18^\circ$ und $p = 746$ mm.

Berechnet für $C_5H_4(CH_3)_3N_4O_3$:

Gefunden:

C 54,54

54,36

H 6,49

6,71

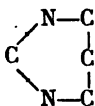
N 18,18

18,10

Trotzdem ist der erhaltene Körper mit dem von Behrend dargestellten Trimethyluracil nicht identisch, er krystallisirt aus Alkohol in Nadeln, während das Trimethyluracil Behrend's in rhombischen Blättchen krystallisirt, sein Schmelzpunkt liegt bei 153°, der des Trimethyluracils bei 109°, ausserdem vermisste ich den charakteristischen Geruch nach Acetamid, den man bei der Darstellung des Behrend'schen Trimethyluracils mit Leichtigkeit constatiren kann.

Einen endgültigen Schluss auf die Atomgruppierung im Thymin gestatten also auch diese Versuche nicht, dagegen ist es mir gelungen, durch Nitrirung des Thymins und nachfolgende Reduction zu einem Körper zu gelangen, der in

und Ammoniak gibt. Dieselbe Reaction gibt nach meinen Beobachtungen auch der von Ascoli¹⁾ im hiesigen Institut jüngst aus Hefe-Nucleinsäure dargestellte Körper $C_4H_4N_2O_2$. Damit ist sowohl für diesen wie für das Thymin die Existenz eines Pyrimidinkernes



mit Sicherheit bewiesen. Der Körper aus Hefenucleinsäure ist also in der That ein Dioxypyrimidin, das Thymin ein Methyldioxypyrimidin, es bleibt jetzt nur noch übrig, die Stellung der H- und O-Atome resp. der Methylgruppe festzustellen.

Beide Körper treten durch diese Befunde zu den Ureiden (Barbitursäure etc.) und den Purinkörpern in enge Beziehung, und die Vermuthung liegt nahe, dass wir in ihnen Vorstufen des Purinkernes zu erblicken haben. Wenigstens lässt sich die dem Uracil äusserst nahe stehende Isodialursäure nach den Versuchen von Behrend²⁾ leicht mit Harnstoff zu Harnsäure condensiren. Die Frage nach der Genese der Harnsäure und der Stellung der Purinkörper im Stoffwechsel tritt jetzt in ein ganz neues Stadium, und es wird von grosser Bedeutung sein, das Verhalten des Methyluracils, des Thymins, der übrigen Pyrimidinderivate und Ureide im Thierkörper festzustellen. Versuche zur Lösung dieser Frage sind bereits im hiesigen Laboratorium begonnen.

Eine ausführliche Mittheilung über die aus dem Thymin gewonnenen Nitro- etc. Produkte wird demnächst in dieser Zeitschrift erfolgen.

1) Ascoli, Ein neues Spaltungsprodukt aus Hefe. Sitzungsberichte der Marburger Gesellschaft zur Bef. der ges. Nat.-Wissenschaften Nr. 7, Aug. 1900. Ref. Chemiker-Zeitung 1900, Nr. 66.

2) Liebig's Annalen, Bd. 251, S. 235.

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des Gehirns.

Von

Emil Wörner und H. Thierfelder.

Mit einer Tafel.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 12. August 1900.)

Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen (Vermeidung einer Temperatur über 50°, Benutzung 85%igen Alkohols) gelang es verschiedenen Untersuchern (Liebreich, Gamgee und Blankenhorn, Baumstark, Ruppel), aus dem Gehirn einen Körper von dem gleichen mikroskopischen Aussehen, den gleichen physikalischen Eigenschaften und annähernd derselben Zusammensetzung zu gewinnen, das sogenannte Protagon. Auch Kossel und Freytag¹⁾ erhielten unter gewissen Bedingungen Substanzen, deren Zusammensetzung den Angaben dieser Forscher entsprach. Daneben wurden aber von ihnen andere Präparate gewonnen, die trotz grosser Sorgfalt bei der Darstellung zu abweichenden analytischen Ergebnissen führten. Sie schliessen daraus, dass es mehrere Protagone gibt.

Das Protagon ist nach der Angabe der älteren Autoren ein äusserst wenig widerstandsfähiger Körper. Umkrystallisiren aus zu starkem Alkohol oder bei zu hoher Temperatur, längeres Kochen mit Aether bewirken schon Zersetzung. Man hält die Protagone für Verbindungen von Lecithin und phosphorfreien Atomcomplexen (Cerebroside). Beim Kochen mit Barytwasser

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 431.

Cerebroside. Diese letzteren kann man auch durch Behandeln einer methylalkoholischen Protagonlösung mit einer methylalkoholischen Barytlösung erhalten (Kossel und Freytag).

Als wir vor einigen Jahren die Untersuchung des Gehirns aufnahmen, war es unsere Absicht, die Zersetzungsprodukte der Cerebroside zu studiren. Um das Ausgangsmaterial zu gewinnen, unternahmen wir zunächst die Darstellung des Protagons. Indem wir uns genau an die Vorschrift hielten, gelang es uns auch ohne Weiteres, Präparate von dem Verhalten und dem mikroskopischen Aussehen (zu Rosetten vereinigte Nadeln) des Protagons zu bekommen. Die Substanz wurde sehr häufig aus 85%igem Alkohol bei 45° umkrystallisirt und schied sich immer wieder in denselben gleichmässigen Formen ab. Die Analysen ergaben aber Werthe, welche sehr erheblich von den für das Protagon gefundenen abwichen. Manche Präparate zeigten einen niedrigeren, andere einen höheren Kohlenstoffgehalt; so lieferten z. B. die Analysen von 5 Präparaten verschiedener Darstellung, die mikroskopisch alle völlig identische und gleichmässige Bilder zeigten, folgende Zahlen:

		C	H	N
1	a	62,44	10,41	3,39
	b	62,43	10,33	3,37
2		62,37	10,53	—
3		64,59	10,83	—
4	1. Fraction	64,62	10,87	—
	4. „	62,71	10,89	—
5		68,97	10,96	—
Protagon nach G. u. B.		66,39	10,69	2,39

Wir machten also dieselben Erfahrungen wie Kossel und Freytag. Da der Weg der weiteren Krystallisation aus 85%igem Alkohol uns aussichtslos erschien, versuchten wir einen benzolhaltigen Alkohol. Das mikroskopische Bild änderte

logische Veränderung erfahren, die wir als Umlagerung bezeichnen (siehe später). Die Vollständigkeit, mit der diese «Umlagerung» erfolgt, bildet ein gutes Kriterium für die Reinheit der Substanz. Dieser charakteristischen Eigenschaft ist es zu danken, dass wir wenigstens diesen einen Stoff in völliger Reinheit zu isoliren vermochten.

Als Ausgangsmaterial dienten uns zunächst die Ausscheidungen, welche sich bilden, wenn die mit 85%igem Alkohol bei 45° hergestellten Auszüge der zerkleinerten und mit Alkohol entwässerten Gehirne abgekühlt werden; später benutzten wir die weisse Masse, die aus den bei gewöhnlicher Temperatur hergestellten ätherischen Auszügen der in eben angeführter Weise vorbehandelten Gehirne beim Abkühlen auf 0° oder unter 0° sich absetzt. Es wurden ausschliesslich menschliche Gehirne benutzt; diese stammten aus dem pathologischen Institut zu Berlin und der städtischen Irrenanstalt Dalldorf. Wir sind Herrn Professor O. Israel und Herrn Dr. E. Nawratzki für freundliche Besorgung zu bestem Dank verpflichtet.

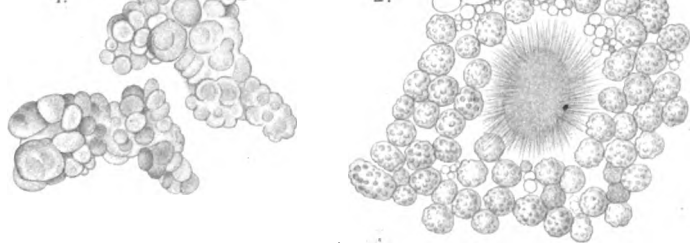
Eine genaue Beschreibung des von uns eingeschlagenen Trennungsverfahrens zu geben, ist unmöglich; nur im Allgemeinen kann der Weg, den wir zu verbessern und zu vereinfachen hoffen, angedeutet werden. Das Ausgangsmaterial wurde zunächst mit 50% benzol- oder 50% chloroformhaltigem Alkohol bei 45—50° behandelt. Dabei bleibt häufig ein kleiner Theil als geschmolzene Masse ungelöst zurück. Beim Erkalten des Filtrats scheidet sich ein Körper ab, der im Wesentlichen aus mikroskopischen knolligen Gebilden besteht und durch wiederholtes Umkrystallisiren aus denselben Lösungsmitteln gereinigt werden kann. Zur Entfernung der letzten Beimengungen empfiehlt sich mehrfache Behandlung mit 10 oder 20% Chloroform enthaltendem Methylalkohol, in dem diese Substanz schwer löslich ist. Wir kommen auf diesen Körper, dem wir den Namen Cerebron geben, alsbald zurück. Die von der Cerebronabscheidung abfiltrirte Mutterlauge liefert beim Verdunsten einen Krystallbrei feiner mikro-

Aethyl- und Methylalkohol löst es sich in der Wärme, um beim Erkalten wieder auszufallen. Die Abscheidungen erfolgen in der Regel in zusammenhängenden Massen, die nicht an der Wandung des Glases haften und sich, ohne auseinander zu reissen, in der Flüssigkeit hin- und herbewegen lassen. Bei genügender Concentration kann auch die ganze Lösung zu einer nicht an der Wandung haftenden lockern Gallerte erstarren. Beim Schütteln zerfällt sie zu grösseren Flöckchen. Die mikroskopischen Bilder, die die Ausscheidungen aus 20% Chloroform enthaltendem Methylalkohol gewähren, sind sehr mannigfach. Man sieht Formen, wie sie der Abbildung in Figur 1 entsprechen, knollige Gebilde mit feinsten kleinen Kügelchen besetzt, ausschliesslich kleine und grössere runde Körper mit glatter Oberfläche. Oft zeigt dasselbe mikroskopische Präparat eine ganze Reihe dieser Bilder neben einander (Figur 2). Fast ganz regelmässig erscheinen neben diesen amorphen Ausscheidungen unzweifelhafte Kristalle, büschelförmig gruppirte Nadeln oder Blättchen (Fig. 2). Auch in heissem Chloroform und heissem Benzol löst sich das Cerebron, die Benzollösung nimmt beim Erkalten das Aussehen und die Consistenz eines dicklichen, schwer flüssigen Kleisters an. In Aceton ist es auch in der Hitze nur wenig löslich. Aus diesem Lösungsmittel, schöner noch aus 20% Chloroform enthaltendem Aceton, scheidet es sich beim Erkalten in schönen grossen Sternen aus, die aus concentrisch zusammengestellten Nadelchen und Blättchen bestehen (Figur 3). Die Nadelchen sind jedenfalls nichts anderes, als von der Seite gesehene Blättchen. Die Lösungen können, ohne dass Zersetzung eintritt, zum Kochen erhitzt werden. Erhitzt man Cerebron im Capillarröhrchen, so beginnt es bei etwa 130° feucht zu werden und sich allmählich mit kleinsten Tröpfchen zu bedecken; erst bei 200° wird es leicht gelblich. Bei langsamem Erhitzen bei 209°, bei schnellem bei 212° schmilzt es zu einer klaren gelblichen Flüssigkeit.

1) Diese und die anderen Abbildungen sind bei 450 facher Vergrösserung gezeichnet.

senem Rohr mit Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale ausgeführt, die Stickstoffbestimmungen nach der Kjeldahl'schen Methode, von deren Anwendbarkeit für die vorliegende Substanz wir uns durch Vergleich mit dem Dumas'schen Verfahren überzeugt hatten. Die Präparate waren stets bei 100° getrocknet, sie stammten von 8 verschiedenen Darstellungen. Die 3 letzten (Stickstoff-)Bestimmungen sind für sich aufgeführt, da sich nicht genau feststellen liess, zu welchen Kohlenwasserstoffbestimmungen sie gehören.

1. 0,1294 g Substanz lieferten 0,3262 g CO₂ und 0,1376 g H₂O, d. i. 68,75 % C und 11,82 % H.
- 2a. 0,1594 g Substanz lieferten 0,4051 g CO₂ und 0,1676 g H₂O, d. i. 69,32 % C und 11,68 % H.
- 2b. 0,1994 g Substanz lieferten 0,5052 g CO₂ und 0,2026 g H₂O, d. i. 69,10 % C und 11,29 % H.
- 3a. 0,1084 g Substanz lieferten 0,2750 g CO₂ und 0,1135 g H₂O, d. i. 69,10 % C und 11,63 % H.
0,2272 g Substanz verbrauchten 3,0 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,85 % N.
- 3b. 0,3038 g Substanz lieferten 0,7715 g CO₂ und 0,3194 g H₂O, d. i. 69,26 % C und 11,68 % H.
4. 0,1690 g Substanz lieferten 0,4300 g CO₂ und 0,1694 g H₂O, d. i. 69,39 % C und 11,13 % H.
5. 0,1801 g Substanz lieferten 0,4559 g CO₂ und 0,1902 g H₂O, d. i. 69,04 % C und 11,73 % H.
0,5578 g Substanz verbrauchten 6,45 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,62 % N.
6. 0,1607 g Substanz lieferten 0,4070 g CO₂ und 0,1647 g H₂O, d. i. 69,07 % C und 11,39 % H.
0,2427 g Substanz verbrauchten 3,4 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,96 % N.
7. 0,1801 g Substanz lieferten 0,4564 g CO₂ und 0,1860 g H₂O, d. i. 69,11 % C und 11,48 % H.
8. 0,1737 g Substanz lieferten 0,4424 g CO₂, d. i. 69,46 % C.
0,2153 g Substanz verbrauchten 2,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,89 % N.
9. 0,8592 g Substanz verbrauchten 10,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,78 % N.
10. 0,7743 g Substanz verbrauchten 9,2 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,66 % N.
11. 0,8752 g Substanz verbrauchten 9,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-Säure, d. i. 1,58 % N.



*Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physikalische Chemie. Band XXX
 Zu „Vörner und Thierpilder. Entzickelung aller die
 chemische Zusammensetzung des organ.“*

zusammengestellt:

	1	2a	2b	3a	3b	4	5	6	7	8	9	10	11	Mittel
C	68,75	69,32	69,10	69,10	69,26	69,39	69,04	69,07	69,11	69,46	—	—	—	69,16
H	11,82	11,68	11,29	11,63	11,68	11,13	11,73	11,89	11,48	—	—	—	—	11,54
N	—	—	—	1,85	—	—	1,62	1,96	—	1,89	1,78	1,66	1,53	1,76

In 85%igem Alkohol suspendirt und einer Temperatur von etwa 50° ausgesetzt, zeigt das Cerebron ein eigenthümliches und charakteristisches Verhalten, auf das schon oben hingewiesen wurde und das für die Erkennung und Isolirung sehr wesentliche Dienste geleistet hat. Die fein vertheilten Theilchen setzen sich zu Boden und backen in kurzer Zeit zu einer zusammenhängenden Masse zusammen. Jetzt beginnt der Process, den wir als Umlagerung bezeichnet haben. Nimmt man nach einiger Zeit (etwa einer Stunde) eine Probe heraus und betrachtet sie unter dem Mikroskop, so sieht man, wie aus den Knollen nadel- und blättchenförmige Krystalle herausgewachsen sind (Figur 4). Eine später entnommene Probe lässt bei der mikroskopischen Untersuchung überhaupt keine Knollen mehr erkennen, alles ist in feine durcheinander geschobene Blättchen, die häufig als unvollkommen ausgebildete sechsseitige Tafeln mit ganz scharfen Begrenzungslinien erscheinen, verwandelt (Figur 5). Mit blossem Auge sieht man die Flüssigkeit mit prachtvoll glänzenden Flitterchen erfüllt. Der makroskopische Anblick erinnert an Cholesterin.

Versuche, die mit wasserreicherem und wasserärmerem Alkohol und bei verschiedenen Temperaturen angestellt wurden, ergaben, dass die Umlagerung unter den angegebenen Verhältnissen am besten und schnellsten erfolgt. Ein reines Cerebronpräparat wird völlig umgelagert. Löst man die Blättchen, so scheiden sie sich in der Regel amorph wieder aus. Nur aus heissem Aceton erfolgt die Abscheidung regelmässig in deutlichen Krystallen, die der durch Umlagerung erhaltenen entsprechen. Dass man unter den in der Hauptsache amorphen Formen, wie sie aus chloroformhaltigem

dagegen kommt diese Eigenschaft dem alkalisch reagirenden Spaltungsprodukt zu. Dass der Zucker Galactose sei, war nach früheren Untersuchungen zu vermuthen. In der That liess er sich durch die Ueberführung in Schleimsäure und in ein Osazon vom Schmelzpunkt 190° als solche erkennen.

Wir sind mit der Untersuchung der Spaltungsprodukte des Cerebrons, sowie mit der Reindarstellung und Untersuchung der oben kurz angedeuteten weiteren Bestandtheile der Marksubstanz beschäftigt.

Ueber das Schicksal einiger isomeren Oxychinoline (Carbostyryl und Kynurin) im Thierkörper.

Von

Dr. Béla v. Fenyvessy,

Assistenten am pharmacolog. Institut der Universität zu Budapest.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Institutes in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 12. August 1900.)

Die ersten Untersuchungen über das Verhalten einiger Chinolinderivate im Thierkörper wurden im Zusammenhange mit der Frage über die Entstehung der Kynurensäure, einer im normalen Hundeharn vorkommenden Oxychinolincarbon-säure, vorgenommen. Die Versuche, die unter Jaffe's Leitung von A. Schmidt¹⁾ und F. Rosenhain²⁾ ausgeführt und in deren Verlaufe auch die in dieser Arbeit zu behandelnden isomeren Oxychinoline berücksichtigt wurden, führten in Bezug auf die gestellte Frage zu keinem positiven Resultate, da Bildung von Kynurensäure nach Verabreichung einer Reihe verwandter Substanzen nicht beobachtet werden konnte. R. Cohn³⁾ nahm die physiologisch-chemische Untersuchung dreier isomerer Methylchinoline (Chinaldin, Ortho- und Paramethylchinolin) in der Erwartung vor, dass dieselben Synthesen mit Produkten des thierischen Stoffwechsels eingehen würden. Dies war aber nicht der Fall, und der Verfasser gelangt zu

1) A. Schmidt. Ueber das Verhalten einiger Chinolinderivate im Thierkörper mit Rücksicht auf die Bildung von Kynurensäure. Inaug.-Dissert. Königsberg 1884.

2) F. Rosenhain. Beitr. z. Kenntniss der Kynurensäurebildung im Thierkörper. Inaug.-Dissert. Königsberg 1886.

3) R. Cohn. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XX, S. 210.

leicht zerstört werden kann. Dass diese These keine allgemeine Gültigkeit für sonstige Chinolinderivate hat, wie es übrigens schon Cohn vermuthete, dafür wurde der Beweis durch die Untersuchungen von E. Rost und von C. Brahm über das physiologisch-chemische Verhalten des Chinosols (ein Gemenge von o-Oxychinolinsulfat und Kaliumsulfat) erbracht. Rost¹⁾ wies nach, dass das o-Oxychinolin im Thierkörper eine Paarung mit Schwefelsäure eingeht. Brahm²⁾ gelang es, aus dem Harn der mit Chinosol gefütterten Hunde und Kaninchen o-Oxychinolinglykuronsäure zu gewinnen.

Diese letztere Arbeit gab die Veranlassung zu weiteren Untersuchungen über das Schicksal isomerer Oxychinoline im Thierkörper.

Das Chinolin ist bekanntlich aus einem Benzol- und einem Pyridinringe zusammengesetzt.

Da das von Rost und Brahm untersuchte Chinolin-derivat im Benzolkern hydroxylirt war, so lag es am nächsten, isomere Körper, die aber die OH-Gruppe im Pyridinkern tragen, auf ihr physiologisch-chemisches Verhalten zu prüfen. Dieser Aufgabe kam ein weiteres Interesse in Folge der nahen Verwandtschaft eines der Py-Oxychinoline zur Kynurensäure zu.

Aus diesem Grunde wurden nachstehende Untersuchungen über das Verhalten von Carbostryl und Kynurin im Thierkörper auf Vorschlag und unter Leitung von Herrn Prof. Thierfelder aufgenommen.

Carbostryl.

$C_9H_7NO(+H_2O)$. — Das nöthige Material wurde von der chemischen Fabrik Th. Schuchardt (Görlitz) bezogen. Das Präparat erwies sich als völlig rein. (Schmelzpunkt: 198-200° C.)

Ueber das Schicksal des Carbostryls im Thierkörper gibt A. Schmidt³⁾ auf Grund zweier Kaninchen-Versuche Folgen-

1) E. Rost, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. 15, 288.

2) C. Brahm, Ueber das Chinosol, sein Verhalten im Thierkörper etc. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 439.

3) l. c.

Kynurensäure, dagegen schien er eine gepaarte Schwefelsäure zu enthalten.> Es wurden je 0,25 g Carbostryl einmal per os, das andere Mal subcutan verabreicht. Giftwirkung wurde nicht beobachtet.

Nachstehende Versuchsergebnisse wurden ebenfalls an Kaninchen gewonnen. Die Thiere wurden mit Hafer ernährt, das Carbostryl wurde in der Regel (die wenigen subcutanen Versuche werden besonders besprochen) per os, und zwar wegen der Schwerlöslichkeit der Substanz in Form von Gummiemulsion zugeführt. Die einmalige Dosis war gewöhnlich 0,5 g (resp. 0,25—0,30 pro 1000 g Körpergewicht). Hierbei traten regelmässig Vergiftungserscheinungen auf; doch waren dieselben gewöhnlich bald überwunden, so dass es zweckmässig erschien, die ohnehin geringe Ausbeute an dem zu besprechenden Harnprodukt nicht durch Einschränkung der Carbostrylzufuhr noch weiter herabzudrücken.

Die Wirkung des Carbostryls äusserte sich in Form von Lähmungserscheinungen. Schon nach 5—10 Minuten nach der Eingabe zeigten die Thiere auffallende Mattigkeit, und nach etwa einer halben Stunde fand man sie mit ganz schlaffen Extremitäten- und Nackenmuskulatur gewöhnlich in Seitenlage; in Rückenlage versetzt, konnten sie sich nicht aufrichten; auf stärkere Reize zeigten die Thiere machtlose Abwehrversuche; Reflexe waren erhalten. Die Athmung, Anfangs beschleunigt, war in diesem Stadium der Lähmung sehr verlangsamt und erschwert. Seitens der Circulation wurden, ausser einer anfänglichen, nicht sehr starken Erweiterung der Ohrgefässe, keine auffälligen Erscheinungen beobachtet. Aus dem beschriebenen Lähmungszustande erholten sich die Thiere gewöhnlich in 3—5 Stunden und verhielten sich dann bis zum nächsten Tage scheinbar ganz normal. Erst bei längerer Behandlung stellte sich eine Abnahme der Fresslust und des Körpergewichtes, sowie ein schwererer Verlauf der Einzelvergiftungen ein. Sodann wurde die Verabreichung von Carbostryl auf einige Tage ausgesetzt, was ohne Zeitverlust geschehen konnte, da gleichzeitig an 3—5 Thieren experimen-

maligen zu grossen Dosen oder aber an schon vorbehandelten Thieren auch nach der gewöhnlichen Gabe beobachtet. In solchen Fällen verblieben die Thiere bis zum Tode 12—24 Stunden lang in dem schweren Lähmungszustande. Der Sectionsbefund war wenig charakteristisch. Als constanter Befund sollen ausgedehnte Blutungen im Magenfundus hervorgehoben werden.

Einen näheren Einblick in das Wesen der Carbostyryl-wirkung gestatteten einige Froschversuche. Frösche, denen man 0,05—0,10 g Carbostyryl in Pulverform in den Magen bringt, zeigen bald dieselben Lähmungserscheinungen, die an den Kaninchen beobachtet wurden. Das Herz eines vollständig gelähmten Frosches schlägt noch viele Stunden lang mit normaler Kraft und Frequenz. An zwei solchen Thieren wurde die Prüfung der elektrischen Erregbarkeit des Plexus ischiadicus und der Schenkelmuskulatur mit Hülfe des Schlittenapparates vorgenommen. Es zeigte sich nun, im Vergleich mit einem normalen Thiere, eine sehr beträchtliche Abnahme der Wirksamkeit der Nervenreizung, dagegen eine ganz geringe oder auch keine Abnahme der direkten Muskeleerregbarkeit.

Somit scheint das Carbostyryl eine curareähnliche Wirkung zu besitzen.

Bezüglich der beschriebenen Magenblutungen soll erwähnt werden, dass Carbostyryl, in Pulverform in das Auge eines Kaninchens gebracht, eine ziemlich starke, wenn auch nur wenige Stunden lang dauernde Röthung der Bindehaut hervorruft.

Der Harn der mit Hafer ernährten Kaninchen ist concentrirt und stark sauer. Am ersten bis zweiten Tage nach Verabreichung von Carbostyryl erschien im Harn oft rechtsdrehender Zucker. Derselbe wurde durch das optische Verhalten, durch die Trommer'sche Probe sowie durch die Gährungsfähigkeit charakterisirt. Nach der Vergärung, sowie an den weiteren Carbostyryltagen auch ohne Vorbehandlung zeigte der Harn eine deutliche Linksdrehung, hielt ziemlich viel alka-

Kochen nicht.

Zur Reindarstellung der linksdrehenden Substanz diene das bekannte Bleiverfahren. Der Harn wurde zunächst mit neutralem, sodann mit basischem Bleiacetat gefällt. Dieser letztere Niederschlag wurde nach Auswaschen mit heissem Wasser im H_2S -Strom entbleit, das Filtrat auf dem Wasserbade eingeeengt; bei geeigneter Concentration schieden sich aus der wiederholt mit Thierkohle behandelten Flüssigkeit voluminöse, aber specifisch leichte Krystallmassen ab, welche durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser leicht gereinigt werden konnten. Es wurden nach Verabreichung von ungefähr 80 g Carbostyryl etwa 4 g dieser Substanz gewonnen.

Die Substanz, eine schneeweiße, weiche Masse besteht aus mikroskopisch kleinen, sternförmig angeordneten Krystallnadeln. Die Substanz hat keinen scharfen Schmelzpunkt; von 220° C. an färbt sie sich allmählich dunkler und bei 250 bis 252° C. verkohlt sie. Sie ist schwer löslich in kaltem, leicht in heissem Wasser, fast unlöslich in Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol etc. In Alkalien löst sich die Substanz sehr leicht auf und wird aus einer concentrirten alkalischen Lösung auf Zusatz von wenig HCl krystallinisch gefällt; in überschüssiger HCl löst sie sich jedoch wieder auf. Die wässrige Lösung der Substanz reagirt sauer, hält viel alkalisches Kupferoxyd in Lösung, reducirt aber beim Kochen nicht. Auf Grund der beobachteten linksdrehenden Eigenschaft des Harns wurde eine gepaarte Glycuronsäure vermuthet und die Spaltung derselben versucht. Gegen Einwirkung von heissen Mineralsäuren erwies sich die Substanz als sehr widerstandsfähig. Erst nach 15—20 Minuten lang fortgesetztem Kochen mit 10%iger HCl gelingt die Reductionsprobe in Spuren, wogegen die von Brahm isolirte o-Oxychinolinglycuronsäure bei derselben Behandlung schon nach 5 Minuten ausgiebige Spaltung erfährt. Zur Prüfung des optischen Verhaltens eignet sich die Substanz wegen ihrer Schwerlöslichkeit nicht. Die angegebenen Eigenschaften der Substanz machten es in hohem Grade wahrscheinlich, dass wir es mit einer gepaarten Gly-

Analyse der Substanz noting.

Die qualitative Untersuchung der Säure ergab die Anwesenheit von C, H und N, aber keinen S.

Zum Zwecke der Elementaranalyse wurde die Substanz im Vacuum über H_2SO_4 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei nur eine ganz geringe Gewichtsabnahme stattfand; eine weitere Gewichtsabnahme trat bei 100° , endlich auch bei 140° nicht ein.

Bei der Verbrennung der Substanz gelang es uns nicht, nur irgendwie übereinstimmende Resultate zu erzielen. Wir verzichteten auf weitere Versuche, da wir uns auf Grund der Erfahrungen von Brahm von der Analyse des Kalisalzes mehr Erfolg versprechen konnten.

Der N-Gehalt der freien Säure wurde nach Kjeldahl mit der Krüger'schen Modification bestimmt. Die Substanz wurde bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

I. 0,1603 g Säure verbrauchten 4,50 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-HCl,

II. 0,1963 „ „ „ 5,50 „ $\frac{1}{10}$ „

Gefunden N $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_8$ verlangt

I. 3,93 % 4,10 %

II. 3,92 %

Einen weiteren Aufschluss über die Zusammensetzung der Substanz erhielten wir durch Titration einer heissen Säurelösung mit $\frac{1}{10}$ N.-KOH.

I. 0,1317 g Säure brauchten zur Neutralisation 3,9 ccm. $\frac{1}{10}$ N.-KOH

II. 0,5592 „ „ „ „ 16,25 „ $\frac{1}{10}$ „

100 g Säure verbrauchen g K

Gefunden $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_8$ verlangt

I. 11,54 11,50

II. 11,33

Kalisalz.

Dasselbe wurde theils durch Umsetzung des Barytsalzes (bereitet durch Neutralisiren der heissen Säurelösung mittelst $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und Entfernen des überschüssigen Ba durch CO_2) mit Hilfe von Kaliumsulfat, theils durch Neutralisiren der freien Säure mit KOH hergestellt. In beiden Fällen wurde die

angeht. Krystallisation konnte aber
ndern erst durch Zusatz von Alkohol
nachträglichem Einengen im Vacuum

irt in schwefelgelben Nadeln, ist
h mehr in heissem Wasser, un-
loroform etc. Die Lösung reagirt
ationsebene stark nach links.
wird die Säure durch Mineral-
nisch abgeschieden.

freie Säure, keinen scharfen
70—272° C. Die im Vacuum
stanz bleibt bei 100—120° C.

de das Kalisalz bei 100°
. Die Substanz erwies
: auch beim Abrauchen

geschlossenem Rohre
rchleitung, N-Bestim-
-Gehalt zu ermitteln,
immer unter Zurück-
ge Werthe lieferte,
bgewogene Menge
en einige Tropfen
edene organische
Lösung befind-
rs in der üb-

lass-roth



	I	II	III	IV	V	VI	Verändert)
C	47,83	47,78	—	—	—	—	47,75 %
H	3,82	4,16	—	—	—	—	4,24 %
N	—	—	3,48	3,43	—	—	3,71 %
K	—	—	—	—	10,49	10,54	10,37 %

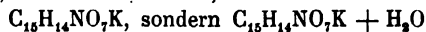
Es handelt sich also hier um eine Carbostyryl-Glycuronsäure (resp. um ihr Kalisalz), der auf Grund der Analysen die Formel $C_{15}H_{17}NO_8$ (resp. $C_{15}H_{16}NO_8K$) zukommt. Die Vereinigung ist also scheinbar ohne Austritt von H_2O verlaufen. Man wird annehmen müssen, dass die Aldehydgruppe der Glycuronsäure zunächst in eine zweiwerthige Alkoholgruppe übergeführt, diese mit dem Carbostyryl unter Austritt von 1 Mol. H_2O zusammengetreten und keine innere Anhydridbildung erfolgt ist. Aehnlich erklärt Blum²⁾ die Zusammensetzung der Dichlorthymolglycuronsäure.

Specifische Drehung des Kalisalzes.

	Gehalt an Substanz in 100 ccm.	Gehalt an Substanz in 100 g	Specifisches Gewicht der Lösung	Länge des Rohrs	Beobachtete Winkeldrehung	Specifische Drehung $[\alpha]_D$
1	4,8192	4,8190	1,019 (18° C.)	2,2	—9,20	—85,17
2	2,3644	2,3680	1,010 (22° C.)	2,2	—4,30	—81,55
3	1,1822	1,1840	1,006 (22° C.)	2,2	—1,93	—73,52

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, nimmt das spezifische Drehungsvermögen des Kalisalzes mit verminderter Concentration der Lösung ab.

1) Auf Veranlassung von Herrn Professor Thierfelder füge ich folgende Berichtigung ein: In der Arbeit von C. Brahm, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 443, muss es nicht heissen:



47,74	47,74
4,45	4,24
3,71	3,71
10,03	10,37

2) F. Blum, Ueber Thymolglycuronsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVI, S. 514.

bezüglich der Paarung mit Glycuronsäure dem o-Oxychinolin ähnlich verhält, war es schon vorneherein zu vermuthen, dass es auch mit Schwefelsäure eine Synthese eingeht.

Dies wurde durch quantitative Bestimmung der vor und nach der Carbostyrylzufuhr ausgeschiedenen Harnschwefelsäuren bewiesen. Folgender Versuch wurde an einem hungernen Kaninchen ausgeführt. Erster Normaltag = zweiter Hungertag.

Doppelte Bestimmungen der H_2SO_4 nach Baumann.

	Milligramm in der 24stündigen Harnmenge		Bemerkungen
	Sulfatschwefelsäure	Gepaarte Schwefelsäure	
1. Normaltag . .	156,30	52,23	60 ccm. Wasser per os.
2. Carbostyryltag	54,25	137,80	0,5 g Carbostyryl in 60 ccm. Emulsion.
3. Normaltag . .	218,6	55,26	60 ccm. Wasser.

Die bedeutende Zunahme der gepaarten und die entsprechende Abnahme der Sulfatschwefelsäuren nach Verabreichung von Carbostyryl weist auf die Bildung von Carbostyrylschwefelsäure hin. Aus den obigen Zahlen lässt es sich berechnen, dass etwa 25% (0,13 g) der eingeführten Substanz in Form von Aetherschwefelsäuren ausgeschieden wurden.

Es sollen zum Schluss zwei Versuche erwähnt werden, in denen das Carbostyryl subcutan verabreicht wurde (ebenefalls in Emulsion). Das eine Kaninchen erhielt 0,5 g, das andere in drei Tagen im Ganzen 1,30 g Carbostyryl. In beiden Fällen stellten sich die schon beschriebenen Lähmungserscheinungen ein; das erste Thier ging zu Grunde, das andere erholte sich bald. Die gesammelten Harne waren optisch inactiv, gaben nach dem üblichen Isolirverfahren keine Krystalle der gepaarten Glycuronsäure, auch konnte solche durch die Reductionsprobe nicht nachgewiesen werden.

$C_9H_7NO(+3H_2O)$. Das Versuchsmaterial wurde nach Schmiedeberg und Schultzen¹⁾ durch Schmelzen der reinen Kynurensäure dargestellt. Nach Monate lang fortgesetztem Sammeln von Kynurensäure gelang es uns, etwa 10 g reines Kynurin zu gewinnen. Die Base krystallisirt in glänzenden, harten Prismen, bei plötzlichem Ausfallen in feinen Nadeln. Die Substanz hat den verlangten Schmelzpunkt von $201^{\circ}C$. Sie ist löslich in Wasser, leichter in Alkohol. Auf Zusatz von Fe_2Cl_6 entsteht eine carminrothe, von Millon's Reagens eine gelbgrüne Färbung. Reines Kynurin gibt die von Jaffé²⁾ für Kynurensäure angegebene Reaction.

Nach A. Schmidt, der einem Kaninchen 0,5 g Kynurin subcutan injicirte, wurde die Substanz unverändert ausgeschieden.

Nach dem negativen Ausfall der subcutanen Carbostyrylversuche (in Bezug auf gepaarte Glycuronsäure) schien es uns vortheilhafter, das Kynurin per os zu verabreichen. So erhielten zwei Kaninchen 9 g Kynurin in wässriger Lösung, zuerst in Dosen von 0,5 g, dann aber 1 g. Dabei zeigten die Thiere gar keine krankhafte Erscheinungen; sie nahmen sogar an Gewicht zu. Somit kann das Kynurin im Vergleich zu dem isomeren Carbostyryl für das Kaninchen als vollkommen unschädlich bezeichnet werden. Nicht so aber für den Frosch. Ein Frosch, der 0,05 g Kynurin subcutan erhielt, zeigte genau dieselben Lähmungserscheinungen bei lange Zeit normaler Herzthätigkeit, wie solche nach Carbostyryl beobachtet wurden.

Der Harn der mit Kynurin verfütterten Kaninchen dreht die Polarisationsebene nach links, und reducirt alkalisches Kupferoxyd nach verhältnissmässig kurzem Kochen mit 10% HCl.

Ein Theil des gesammelten Harnes wurde nach dem von Schmidt angegebenen Verfahren bearbeitet. Der Harn wurde eingedampft, mit Alkohol erschöpft, der Alkohol verdunstet, der Rückstand mit schwefelsaurem Aether geschüttelt und der

1) Schmiedeberg u. Schultzen, Ann. d. Chemie u. Pharm., 164, Seite 155.

2) Jaffé, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. VII, S. 399.

versetzte klare Lösung des Kalisalzes trübte sich beim Kochen mit HCl. Eine Verunreinigung mit gepaarten Schwefelsäuren konnte ausgeschlossen werden, da das Kalisalz wiederholt umkrystallisirt und mikroskopisch völlig einheitlich war.

Der Körper ist also complicirter zusammengesetzt, als wir vermutheten. Zur Aufklärung dieser Zusammensetzung ist weiteres Material nöthig, mit dessen Herstellung wir beschäftigt sind.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Prof. Thierfelder für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Unterstützung, die er mit Rath und That mir gütigst zu Theil werden liess, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Zur Kenntniss der Extractivstoffe der Muskeln.

Von

Wl. Gulewitsch und S. Amiradžibi.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Der Redaction zugegangen am 18. August 1900.)

Die Muskeln mit ihren zahlreichen Extractivstoffen, deren genaue Kenntniss unsere Vorstellungen von dem Chemismus des Umsatzes der complicirteren Bestandtheile dieser Organe bedeutend zu erweitern im Stande ist, haben schon öfters als Object der chemischen Untersuchungen gedient. Trotz vieler in dieser Richtung ausgeführten Arbeiten kann man aber nicht leugnen, dass unsere Kenntnisse von den Extractivstoffen der Muskeln noch ziemlich dürftige sind und dass die Anwendung neuer Untersuchungsmethoden manche bis jetzt nicht bekannte Verbindungen darin aufdecken wird. Beträgt doch z. B. der Stickstoffgehalt der aus den Extractivstoffen der Muskeln isolirten chemischen Individuen nur einen Bruchtheil des gesammten Stickstoffgehaltes des Fleischextractes. Da wir somit Gründe hatten, eine Reihe von bis jetzt nicht bekannten stickstoffhaltigen Bestandtheilen darin zu vermuthen, haben wir eine chemische Untersuchung der Muskelextractivstoffe unternommen, die zur Auffindung des Carnosins, einer neuen organischen Base, geführt hat und deren Resultate weiter unten mitgetheilt werden sollen.¹⁾

Für die Untersuchung haben wir 460 g Liebig'sches Fleischextract verwandt, welches in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit einer concentrirten Lösung von Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines grösseren Ueberschusses derselben ausgefällt wurde. Der enorme Niederschlag wurde nach 24 Stunden abgesaugt, ausgewaschen und

¹⁾ Eine vorläufige Mittheilung wurde in den Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1902 veröffentlicht.

$t = 20^\circ$ und $l = 200$ mm. zeigte¹⁾ $\alpha = + 2,81$ Theilstriche (400 Theilstriche = 360 Kreisgrade), d. h.

$$[\alpha]_D^{20} = + 22,3^\circ.$$

Die polarisirte Lösung wurde stark eingedampft und die Substanz daraus durch Alkoholzusatz auf die oben beschriebene Weise abgeschieden. Das Salz schmolz unter starker Zersetzung bei $211\text{--}212^\circ$. Die Lösung desselben zeigte eine schwachsaure Reaction auf Lackmuspapier, veränderte aber die Farbe des Congopapiers nicht. Das Salz wurde bei 120° getrocknet, wobei es kein Krystallwasser verlor, und analysirt.

I. 0,2861 g Substanz gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,3967 g CO_2 und 0,1388 g H_2O .

II. 0,2017 g Substanz lieferten beim Verbrennen mit Bleichromat 0,2791 g CO_2 und 0,0986 g H_2O .

III. Aus 0,2848 g Substanz resultirten 59,95 ccm. feuchter N (16° ; 751 mm. Bar.).

	Gefunden:			Berechnet für	
	I.	II.	III.	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$
C	37,82 %	37,74 %	—	37,32 %	37,07 %
H	5,44 %	5,48 %	—	5,24 %	5,89 %
N	—	—	24,17 %	24,26 %	24,09 %
O	—	—	—	33,18 %	32,95 %

Die Resultate der Analysen stimmen somit besser mit der Formel $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$ überein.²⁾

Carnosin wurde aus dem Nitrate durch die Fällung desselben mit der Phosphorwolframsäure dargestellt. Der aus dem heissen Wasser umkrystallisirte Niederschlag wurde durch Barythydrat auf die bekannte Weise zersetzt. Das Carnosin ist in Wasser sehr leicht löslich; aus der wässerigen Lösung, die eine starke alkalische Reaction hat, wird es durch Alkohol gefällt. Die Verbindung schmilzt unter starker Zersetzung bei 239° . Das Carnosin krystallisirt in mikroskopischen flachen

1) Die Beleuchtung war etwas ungünstig.

2) Der Kohlenstoffgehalt wurde um etwa 0,4 % höher gefunden, was bei der Verbrennung eines Nitrates trotz der vorgelegten reducirten Kupferspiralen leicht der Fall sein kann.

Kante parallel, welche die Axe der kleineren Elasticität ist.

Saures Carnosinsilbernitrat wurde durch Vermischen von Carnosinnitrat mit einem Ueberschuss von Silbernitrat dargestellt; die zur Syrupdicke eingedampfte Flüssigkeit wurde mit absolutem Alkohol durchgerührt, der ausgeschiedene Niederschlag abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen, um das überschüssige Silbernitrat zu entfernen. Die übrig gebliebene Substanz war in Wasser sehr leicht löslich. Die zum Syrup eingedampfte sauer reagirende Lösung derselben krystallisirte bei längerem Stehen in mikroskopischen langen schiefen oder rhomboidalen Tafeln, deren spitze Winkel häufig abgestumpft waren. Bei der leichten Löslichkeit der Substanz und der geringen Menge derselben konnte sie weiter nicht gereinigt werden.

Carnosinsilber. Die mit Wasser verdünnte Lösung von saurem Carnosinsilbernitrat wurde mit $\frac{1}{10}$ N.-Kalilauge bis zur Bildung einer geringen gelborangen Fällung versetzt, die Lösung filtrirt und mit einigen weiteren Cubikcentimeter Kalilauge gemischt, wobei eine schwache rein weisse Trübung entstand. Die schwach alkalisch reagirende Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade stark eingedampft, wobei eine geringe Schwärzung eintrat. Beim Stehen verwandelte sich die Flüssigkeit in eine vollständige durchsichtige Gallerte, in der keine Krystalle unter dem Mikroskop zu bemerken waren. Beim Erwärmen löste sich die Gallerte vollkommen auf und die von einer geringen Menge reducirten Silbers abfiltrirte Flüssigkeit schied nach dem Erkalten und beim Umrühren einen kurz- und feinfaserigen Niederschlag aus, der beim Stehen etwas gallertartig wurde. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen, im Vacuum getrocknet und analysirt.

IV. 0,1306 g Substanz in Wasser unter Zusatz von HNO_3 gelöst und mit HCl gefällt gaben 0,0811 AgCl .

Gefunden:

IV.

Ag 46,74 %

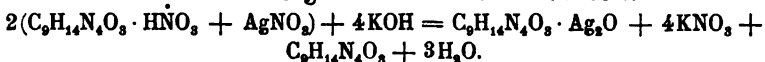
Berechnet für

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

47,11 %.

Es war somit die erhaltene gallertige Substanz das Carnosinsilber $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ resp. $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{Ag}_2\text{O}$, das dem

und sich aus dem Doppelsalze mit dem Silbernitrate ebenfalls unter Freiwerden der organischen Base bilden soll:



Wie für die Bildung von Argininsilber, so ist auch für die des Carnosinsilbers die Mitwirkung von einem fixen Alkali nothwendig: setzt man zu einer Lösung von Carnosin- und Silbernitrat Barytwasser oder Kali- resp. Natronlauge, so bekommt man einen voluminösen weissen Niederschlag von Carnosinsilber, dessen Bildung ausbleibt, wenn Ammoniak, selbst äusserst vorsichtig, anstatt des fixen Alkali zugesetzt wird. Das Carnosin verhält sich somit in dieser Hinsicht dem Arginin analog und von dem Histidin verschieden.

Die zwischen dem Carnosin- und dem Argininsilber existirende Analogie wird dadurch noch auffallender, dass auch das Carnosin eine mehr Silber enthaltende Silberbase bilden kann. Als nämlich das Filtrat von dem oben beschriebenen Carnosinsilber mit Wasser verdünnt und mit $\frac{1}{10}$ N.-KOH fractionirt und unter gutem Umrühren weiter gefällt wurde, entstanden zwei voluminöse, gallertartige, schneeweisse Niederschläge (Nr. 1 und 2), welche abfiltrirt und mit Wasser, Alkohol und Aether in einem verdunkelten Zimmer sehr sorgfältig ausgewaschen wurden, was viel Zeit in Anspruch genommen hat. Die Niederschläge wurden dann im Vacuum getrocknet und analysirt.

V. 0,1987 g Substanz Nr. 1 gaben beim Verbrennen im Schiffchen. 0,1785 g CO_2 , 0,0581 g H_2O und 0,0958 g Ag.

VI. 0,1866 g Substanz Nr. 2 in Wasser unter Zusatz von HNO_3 gelöst und mit HCl gefällt lieferten 0,1225 g AgCl.

	Gefunden:		Berechnet für
	V.	VI.	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{Ag}_2\text{N}_4\text{O}_4$:
C	24,50%	—	23,57%
H	3,28%	—	3,09%
Ag	48,21%	49,42%	47,11%.

Also enthielten diese zwei Substanzen mehr Kohlenstoff und mehr Silber, als es für die Formel $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8 \cdot \text{Ag}_2\text{O}$ be-

1) Wl. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 205.

aus der Luft anzieht und ausser der Verbindung mit 2 Atomen Silber noch Verbindungen mit einem höheren Gehalt an Silber, vermuthlich eine mit 3 Atomen Silber, bildet. Dasselbe wurde auch bei mehreren Präparaten von Argininsilber beobachtet.¹⁾ Es ist bemerkenswerth, dass der Silbergehalt der Substanz Nr. 2, wie auch der der meisten Präparate von Argininsilber, dem Silbergehalte einer Verbindung resp. eines Gemisches von 3 Molekülen der Silberbase mit 2 Atomen Silber und 1 Molekül der Silberbase mit 3 Atomen Silber entspricht:

Gefunden für	Berechnet für
das Carnosinsilber Nr. 2:	$3\text{C}_6\text{H}_{14}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_4 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_4$:
Ag 49,42%	49,66%
Gefunden für	Berechnet für
3 Präparate von Argininsilber:	$3\text{C}_6\text{H}_{14}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_3 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{Ag}_3\text{N}_4\text{O}_3$:
55,68%; 55,83% und 55,75%; 55,60%	56,10%.

Das Carnosinsilber schmilzt beim Erwärmen nicht, sondern wird bei etwa 195° C. ganz schwarz und bläht sich dabei auf.

Das trockene Carnosinsilber stellt eine weisse Masse dar, die sich leicht zu einem sehr feinen Pulver zerreiben lässt. Das Carnosinsilber ist lichtempfindlich. Es löst sich sehr schwer in kaltem Wasser, etwas leichter in heissem; in Säuren und in Ammoniak löst sich die noch feuchte Verbindung leicht auf. Die Löslichkeit derselben in Wasser wird durch die Gegenwart des freien Carnosins bedeutend erhöht; in Folge dessen löst sich der durch ein Alkali in einer Lösung von Carnosinsilbernitrat erzeugte Niederschlag in Wasser merklich, besonders beim Erwärmen, während derselbe Niederschlag in ausgewaschenem Zustande, wie auch die bei Gegenwart von überschüssigem Silbernitrat dargestellte Verbindung in Wasser sehr schwer löslich sind. Durch die Gegenwart überschüssigen Silbernitrats wird nämlich die Bildung des freien Carnosins verhindert. Für die Löslichkeitsbestimmung wurde das Carnosinsilber Nr. 2 verwendet; dasselbe wurde sehr sorgfältig ausgewaschen und eine längere Zeit mit destillirtem Wasser unter häufigem Schütteln digerirt; aus dem Filtrate wurde

¹⁾ Wl. Gulewitsch, l. c., S. 206.

wurde der Gehalt dieses Carnosinsilbers an Silber gleich 49,42% angenommen.

VII. 290 ccm. der Lösung gaben 0,0272 g AgCl.

Daraus folgt, dass sich in 1 Liter destillirten Wassers 0,067 g Carnosin in Form von Carnosinsilber bei der gewöhnlichen Temperatur lösen. Das Carnosinsilber ist somit beinahe zweimal so löslich als Argininsilber; im Uebrigen sind aber die Löslichkeitsverhältnisse dieser Verbindungen ganz analog.

Carnosinkupfer. Beim Kochen der Lösung von reinem Carnosin mit Kupfercarbonat entstand eine tief blaue Lösung, aus der kleine dunkelblaue Kryställchen sich schon während des Kochens an der Oberfläche der Flüssigkeit, hauptsächlich aber an den Wänden des Gefässes ausschieden. Die durch den Heisswassertrichter filtrirte Lösung lieferte dieselben Krystalle, die ausgewaschen, bei 125° C. getrocknet¹⁾ und analysirt wurden:

VIII. 0,2323 g Substanz gaben beim Verbrennen im Schiffchen 0,3009 g CO₂, 0,1051 g H₂O und 0,0606 g CuO.

IX. 0,2666 g Substanz lieferten 43,0 ccm. feuchten N (21° C., 748 mm. Bar.)

X. 0,2599 g Substanz gaben 41,9 ccm. feuchten N (22,5° C., 747 mm. Bar.).

	Gefunden:			Berechnet für	
	VIII.	IX.	X.	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃ · CuO:	C ₉ H ₁₆ N ₄ O ₃ · CuO:
C	35,33%	—	—	35,31%	35,08%
H	5,07%	—	—	4,62%	5,25%
N	—	17,99%	17,82%	18,36%	18,24%
Cu	20,85%	—	—	20,79%	20,65%
O	—	—	—	20,92%	20,78%

Das Carnosinkupfer zersetzt sich bei etwa 220° C. vollständig, ohne zu schmelzen. Obgleich die Verbindung in kaltem Wasser schwer löslich ist, eignet sich dieselbe wenig zur Isolirung und Reinigung des Carnosins, da der Löslichkeitsunterschied in kaltem und in heissem Wasser nicht genügend gross ist; um das Carnosinkupfer in die Lösung zu bringen,

1) Die Substanz war schwer zur Gewichtsconstanz zu bringen; es ist möglich, dass die Verbindung bei 125° C. Spuren z. B. von Ammoniak verliert.

auf eine auffallende Analogie aufmerksam machen, die zwischen den Verbindungen von Carnosin und denen von Arginin nicht zu verkennen ist. Das Verhalten bei dem Isolirungsverfahren, die Eigenschaften von den Nitraten, von den freien Basen, vor Allem aber von den Silberbasen, die Einwirkung auf das polarisirte Licht, die Fähigkeit, Silber- und Kupferdoppelsalze¹⁾ zu bilden, sind dem Carnosin und dem Arginin gemeinsam. Die bis jetzt beobachteten Unterschiede zwischen den Verbindungen dieser und jener Base sind nur quantitativ; so sind alle bis jetzt untersuchten Verbindungen von Carnosin leichter löslich als die von Arginin; desgleichen ist das Molekular-drehungsvermögen von Carnosinnitrat grösser als das von Arginnitrat.

Weitere Untersuchungen über das Carnosin und in erster Linie die Versuche über die Spaltung dieser interessanten Base, wie auch über ihre etwaige pharmakologische Wirkung werden von uns in Angriff genommen. Obgleich die Vermuthung sehr unwahrscheinlich ist, dass eine Verbindung von der Zusammensetzung des Carnosins ein künstliches Produkt sei, das sich bei der Bereitung des Fleischextractes gebildet habe, sollen doch zum Ueberfluss auch Untersuchungen über das Vorkommen von Carnosin in den aus den Muskeln mit den nöthigen Cautelen dargestellten Auszügen ausgeführt werden.

Akulowka, den 8. August 1900.

¹⁾ Das Carnosin bildet ein Kupfernitratsdoppelsalz, welches nicht näher untersucht wurde.

sburg.

